



**Universidad de Buenos Aires**

Facultad de Farmacia y Bioquímica

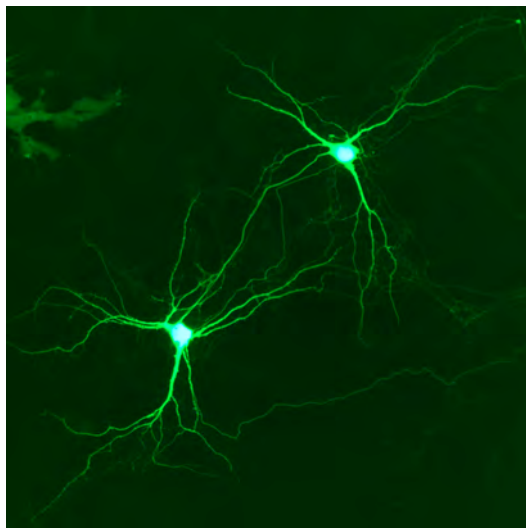
Instituto de Biología Celular y Neurociencias

“Prof. Dr. Eduardo De Robertis”

CONICET-UBA

**Estudio de las subunidades del receptor NMDA y la memoria en ratas de  
genotipo salvaje y transgénicas modelo de la Enfermedad de Alzheimer**

**Desarrollo de vectores virales neurotrópicos *ad hoc***



Autora

**Bioq. Alejandra Inés Aguirre**

Directora

**Dra. Diana Alicia Jerusalinsky**

Co-Director

**Dr. Alberto Luis Epstein**

Consejero de Estudios

**Dr. Christian Höcht**

**2014**



# **Estudio de las subunidades del receptor NMDA y la memoria en ratas de genotipo salvaje y transgénicas modelo de la Enfermedad de Alzheimer**

## **Desarrollo de vectores virales neurotrópicos *ad hoc***

### **RESUMEN**

Los receptores NMDA (RNMDA) están involucrados en plasticidad sináptica y en procesamiento de memorias. El hipocampo es una estructura cerebral que participa en la formación de memorias de largo plazo (MLP), y se encuentra afectada tempranamente en la Enfermedad de Alzheimer (EA).

Investigamos los niveles de subunidades del RNMDA luego de la formación de una memoria dependiente de hipocampo, en ratas de genotipo salvaje (Controles) y transgénicas (Tg) modelo de la EA (McGill-R-Thy1-APP), adultas jóvenes y de 1 año. Evaluamos memoria de trabajo (MT) en una sesión de 5 minutos en un campo abierto (CA) y MLP en dos sesiones de 5 minutos separadas por 24 horas. Analizamos los niveles de las subunidades GluN1, GluN2A y GluN2B en hipocampo por *Western blot*, luego del CA.

En Controles adultos jóvenes hubo MT y, a los 70 minutos, hubo aumento de GluN1 y GluN2A en hipocampo. A las 24 horas, los niveles de GluN1 y GluN2A fueron similares a los observados inmediatamente luego de la sesión (C0), indicando que los aumentos fueron transitorios. Ratas Controles expuestas a dos sesiones de 5 minutos, expresaron una MLP de habituación al ambiente. No hubo cambios en los niveles de GluN1 y GluN2A a los 70 minutos de la segunda sesión, ya que fueron similares a los de C0. Tampoco observamos cambios luego de sesiones de 1 minuto, ni se formó MLP. Concluimos entonces que el aumento observado no estaría relacionado con la mera exposición al CA o con su exploración, sino que podría tener relación con la memoria formada.

Ratas Controles de 1 año evidenciaron MT y formación de MLP de habituación al CA. Sin embargo, GluN1 y GluN2A no aumentaron en hipocampo a los 70 min del CA. Esto sugiere que el mecanismo por el cual se produce aumento de GluN1 y GluN2A luego de habituación, podría estar modificado en el envejecimiento, y que dicho aumento no sería un mecanismo requerido para la formación de la MLP de habituación.

En Tg adultas jóvenes hubo MT y se observó marcada tendencia de aumento de las subunidades GluN1 y GluN2A 70 minutos luego del CA. En Tg de 1 año hubo MT y MLP, pero los niveles de GluN1 y GluN2A 70 minutos después de una sesión de CA no fueron diferentes de los niveles en T0, inmediatamente luego del CA.

Los incrementos en GluN1 y GluN2A podrían estar relacionados con el establecimiento/persistencia de la plasticidad sináptica, contribuyendo a la transición de potenciación de largo plazo (LTP) temprana a LTP tardía, en algún momento luego de la inducción, aunque nuestros resultados sugieren que no se trata de un cambio requerido para establecer la MLP.

Un incremento en la relación GluN2A/GluN2B podría ser una consecuencia adaptativa compensatoria/homeostática una vez que la sinapsis sufre algún cambio plástico, como la potenciación, disminuyendo la probabilidad de plasticidad sináptica posterior y, tal vez, protegiendo el cambio plástico.

Este mecanismo podría estar alterado en edades avanzadas, tal vez por desregulación de la expresión del RNMDA y de GluN2A en particular. En las ratas Tg de 1 año, los niveles de GluN2A en T0 (basales) fueron mayores que en el grupo Control, sugiriendo una alteración en la regulación basal de las subunidades. Los oligómeros de péptidos del  $\beta$ -amiloide ( $\alpha\beta$ A) parecen unirse preferencialmente a los RNMDA conteniendo GluN2B, que se internalizarían en mayor proporción que los RNMDA conteniendo GluN2A, por lo que el aumento podría ser una consecuencia, incluso protectora, de la sinapsis atacada.

Utilizando neuronas de hipocampo en cultivo, estimuladas con pulsos repetidos de KCl, observamos que 30 minutos después de la estimulación hubo aumento de GluN1 y GluN2A (inmunofluorescencia) en las espinas “dendríticas”, sin modificación en la inmunofluorescencia total, lo que sugiere relocalización de subunidades desde *pooles* intracelulares. A los 70 minutos hubo aumento de GluN1 y GluN2A en las dendritas y en la inmunofluorescencia total, sugiriendo aumento en la síntesis, en concordancia con los resultados *in vivo*. No se detectaron cambios en GluN2B.

Para investigar el rol específico de GluN2A y GluN2B en la formación de memorias, desarrollamos vectores amplicón 2A(AS) y 2B(AS) que, mediante la expresión de ARN antisentido (AS), resultaron eficientes para disminuir la expresión de las subunidades respectivas *in vitro*.

Evaluamos el desempeño en CA y en evitación Inhibitoria (EI) de ratas inoculadas en el hipocampo con vectores 2A(AS) y 2B(AS).

Ratas inoculadas con vectores 2A(AS) o con un vector control, mostraron MT y formación de MLP. En las ratas inoculadas con vectores 2B(AS) hubo MT, aunque más tardía y deficiente que en los otros grupos, y esos animales no formaron MLP de aquellas tareas.

Resultados previos de nuestro laboratorio demuestran que la infección del 6-7% de las células de CA1 con vectores amplicón expresando ARN AS contra GluN1 (Cheli y col., 2006) fue suficiente para afectar el desempeño comportamental. Aunque no pudimos verificar el *knock-down* de las subunidades GluN2A y GluN2B *in vivo* en los hipocampos, verificamos su efectividad *in vitro*. En un futuro se deberán hacer estudios en cortes seriados para determinar las células infectadas, y aquellas con disminución efectiva de las subunidades respectivas.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con vectores 2B(AS), la subunidad GluN2B a la que se unirían los  $\alpha\beta$ A no constituiría un blanco aceptable para una terapia de EA, por lo que decidimos desarrollar un anticuerpo monocatenario, específico contra  $\alpha\beta$ A, construimos el plásmido para su expresión en células eucariotas y luego, los vectores amplicón, como una posible terapia experimental contra la EA.

**Parte de los resultados de esta Tesis han sido publicados en:**

- ***NMDA receptor subunits in the adult rat hippocampus undergo similar changes after 5 minutes in an open field and after LTP induction.*** Baez MV, Oberholzer MV, Cercato MC, Snitcofsky M, Aguirre AI, Jerusalinsky DA. (2013) PLoS One, 8(2):e55244.
- ***Improvements in HSV-1 derived amplicon vectors for gene transfer.*** Melendez ME\*, Aguirre AI\*, Baez MV, Bueno CA, Salvetti A, Jerusalinsky DA, Epstein AL. En: *“Advances in Viral Genomes Research”*. Editores: Borrelli JA, Giannini YD. Editorial: Nova Science Publishers, Nueva York, Estados Unidos. (2013) Páginas 1-49.  
\* Melendez ME y Aguirre AI: contribución equivalente en la publicación.
- ***Hippocampal NMDA receptors and the previous experience effect on memory.*** Cercato MC, Colettis N, Snitcofsky M, Aguirre AI, Kornisiuk E, Baez MV, Jerusalinsky DA. (2014) Journal of Physiology – Paris, 108(4-6): 263-9.

*En la portada se muestra una microfotografía de un cultivo primario de neuronas de hipocampo de rata infectado con vectores amplicón conteniendo una secuencia que codifica un ARN antisentido contra la subunidad GluN2B del RNMDA, y una secuencia que codifica la EGFP como proteína reportera. Imagen obtenida por microscopía de fluorescencia.*



## Agradecimientos

A mi familia, a mis amigos, a mis compañeros, a mis colegas y a mis directores.

Agradezco a todos los que me acompañaron en este camino\*,  
por cada charla, cada risa, cada palabra, cada gesto, cada abrazo.

Agradezco el haber conocido lugares increíbles, el haber vivido experiencias inolvidables,  
el haber encontrado personas que tocaron profundamente mi corazón y que me permitieron  
entrar en su mundo, muchos de ellos a quienes hoy tengo el orgullo de llamar amigos.

Agradezco las imágenes que quedarán grabadas por siempre en mi memoria, cada hora  
en el microscopio, cada célula infectada, cada banda resplandeciente, cada placa revelada.  
Hay un mundo que no todos tienen la dicha de conocer, y yo lo conozco.

Por cada experiencia que hoy forma parte de mí, agradezco.

### **Lo que hoy forma parte de mí me permite ver el mundo con otros ojos**

\* Diego -mi *Sensei*-, mamá, papá, Sebas, Gaby, Leo, Lore; Javier y mi Abue, que me  
acompañan desde el cielo; Ana, Dani, Pau; familia Carbone, familia Curotto, familia Di Stéfano;  
Vikus, Maga, Flora, Nathan, Marine, Martín, Edgar, Carlos, Andrés, Nico, Gonzalo, Verónica, Carlos;  
Diana, Alberto; Javier; Vito, Ale, Fran, Gaby, Lucho, Jen, Eze, Jero, Trini, Andre,  
Manu, Paula; Gaby, Sole, Viky; Flavia, Paty, Analía; Christian, Roberto;  
Karine, Coline, Pascal, Matías, Lore, Rachel, Ludovic, Héloïse, Anna, Ana, Aleth, Aldo, Claire; Jhony,  
Ricardo, Tarán, Caro, Rico, Lionel, Olivier, Benjamin, Frédéric, Veronique, Paulina, Erika, Antonella,  
Ana, Elisa, Mariana, Loïc, Ruby; la gente del IBCN, del CGPhIMC, del CIRI y de la ENS de Lyon;  
Marie, Sil, Lu, Val, Ale, Mara, Gajo, Jesi, Nadia, Viky, Ari, Noe, Pochi; Fabo, Diego, Joan; Gaby, Leo,  
Nacho; Mati; Bobe, Juli, Dani, Guille, Mati, Lu, Anyul, Sergio, Zuni, Noe, Laura, Julián:

**¡Gracias!**





A mi familia



**Estudio de las subunidades del receptor NMDA y la memoria en ratas de genotipo salvaje y transgénicas modelo de la Enfermedad de Alzheimer**

**Desarrollo de vectores virales neurotrópicos *ad hoc***



## ABREVIATURAS

$\alpha$ APPs	fragmento $\alpha$ APP soluble
$\alpha$ CTF	fragmento $\alpha$ carboxilo terminal
$\beta$ A	$\beta$ -Amiloide
$\beta$ APPs	fragmento $\beta$ APP soluble
$\beta$ CTF	fragmento $\beta$ carboxilo terminal
2A(AS)	GluN2A Antisentido
2B(AS)	GluN2B Antisentido
AAV	virus adeno-asociado
ADDL	(del inglés <i>amyloid-<math>\beta</math> derived diffusible ligand</i> )
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNdc	ADN doble cadena
AICD	(del inglés, <i>APP intra cellular domain</i> )
AP	Antero-posterior
APP	Proteína Precursora de Amiloide (del inglés <i>Amyloid precursor protein</i> )
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AS	Antisentido
BE	Extremo romo (del inglés <i>Blunt-end</i> )
BSA	Seroalbúmina bovina (del inglés <i>Bovine serum albumin</i> )
CA	Campo abierto
CAM	Condicionamiento auditivo del miedo
CaMKII	Calcio-calmodulina kinasa II
CCM	Condicionamiento contextual del miedo
CIP	Fosfatasa alcalina (del inglés <i>Calf intestinal alkaline phosphatase</i> )
CTL	Control
DCT	Dominio carboxilo-terminal
DIV	Días <i>in vitro</i>
DMEM	(del inglés <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> )
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNT	Dominio amino-terminal
dNTP	(del inglés <i>Deoxynucleotide triphosphate</i> )
DTM	Dominio transmembrana
DUA	Dominio de unión a agonistas
DV	Dorso-ventral
EA	Enfermedad de Alzheimer
EGFP	(del inglés <i>Enhanced green fluorescent protein</i> )
EI	Evitación inhibitoria
Fc	(del inglés <i>Fragment crystallizable region</i> )
GAPDH	(del inglés <i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i> )
hA $\beta$ PP	(del inglés <i>human amyloid-<math>\beta</math> precursor protein</i> )
HBSS	(del inglés <i>Hank's Balanced Salt Solution</i> )
hCMV	(del inglés <i>Human cytomegalo virus</i> )
HRP	Peroxidasa de rábano (del inglés <i>Horseradish peroxidase</i> )
HSV-1	Virus herpes simplex tipo-1 (del inglés <i>Herpes simplex virus type 1</i> )
ICTC	Inmunofluorescencia Celular Total Corregida
IgG	Inmunoglobulina G
IP	Intra-peritoneal

IPF	Intensidad promedio del fondo
KD	(del inglés <i>Knock-down</i> )
KDa	KiloDaltons
KO	(del inglés <i>Knock-out</i> )
kpb	Kilopares de bases
LAM	Laberinto Acuático de Morris
LB	Luria-Bertani
LL	Látero-lateral
LO	Localización de objetos
LTD	Depresión de larga duración (del inglés <i>Long term depression</i> )
LTP	Potenciación de larga duración (del inglés <i>Long term potentiation</i> )
MAPK	(del inglés <i>mitogen-activated protein kinases</i> )
MCP	Memoria de corto plazo
MEK	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
MLP	Memoria de largo plazo
MOI	Multiplicidad de infección (del inglés <i>Multiplicity of infection</i> )
MT	Memoria de trabajo
NB	Neurobasal
ON	Durante una noche (del inglés <i>Overnight</i> )
ORF	Marco abierto de lectura (del inglés <i>Open reading frame</i> )
o $\beta$ A	oligómero del $\beta$ -Amiloide
P/S	Penicilina/estreptomicina
PB	<i>Buffer</i> fosfato
pb	Pares de bases
PBS	<i>Buffer</i> fosfato salino (del inglés <i>Phosphate saline buffer</i> )
PC	Porcentaje de congelamiento
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés <i>Polymerase chain reaction</i> )
PKA	(del inglés <i>Protein kinase A</i> )
RNMDA	Receptor N-metil D-aspartato
RNMDA-GluN2A	Receptor N-metil D-aspartato conteniendo GluN2A
RNMDA-GluN2B	Receptor N-metil D-aspartato conteniendo GluN2B
RON	Reconocimiento de objetos novedosos
ROS	Especies reactivas del oxígeno (del inglés <i>Reactive oxygen species</i> )
S	Sentido
scFv	Anticuerpo monocatenario (del inglés <i>Single chain variable fragment</i> )
SDS	(del inglés <i>Sodium dodecyl sulfate</i> )
SEM	Error estándar de la muestra (del inglés <i>Standard error of the mean</i> )
SFBi	Suero fetal bovino inactivado
SN	Sobrenadante
SNC	Sistema nervioso central
SP	Péptido señal de la pre-pro-tripsina (del inglés <i>Signal peptide</i> )
TA	Temperatura ambiente
TBE	(del inglés <i>Tris/Borate/EDTA</i> )
te	Prueba, test
tr	Entrenamiento
TTBS	(del inglés <i>Tween-20 Tris-buffered saline</i> )
UFP	Unidades formadoras de placa
UL	Único largo
US	Único corto (del inglés <i>Unique short</i> )
UT	Unidades transductoras

# TABLA DE CONTENIDOS

Resumen .....	i
Agradecimientos .....	v
Dedicatoria .....	vii
Abreviaturas .....	xi

## CAPÍTULO I

### Subunidades del RNMDA y memoria en ratas de genotipo salvaje y Tg modelo de la EA

INTRODUCCIÓN .....	3
Neurotransmisión glutamatérgica .....	5
Receptores NMDA .....	5
RNMDA y memoria .....	10
RNMDA y Enfermedad de Alzheimer .....	12
OBJETIVOS .....	19
Objetivos generales .....	21
Objetivos específicos .....	21
MATERIALES Y MÉTODOS .....	23
Animales .....	25
Sujetos experimentales .....	25
Genotipificación .....	25
Campo abierto .....	27
Cultivo primario de neuronas .....	28
Estimulación por pulsos de KCl .....	30
Inmunocitoquímica .....	30
Cuantificación .....	31
<i>Western blot</i> .....	31
Disección de estructuras cerebrales .....	31
Preparación de muestras .....	32

Electroforesis en gel de poliacrilamida .....	32
Semi-cuantificación .....	33
<b>Análisis estadístico .....</b>	<b>34</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>35</b>
<b>Subunidades del RNMDA y memoria en ratas de genotipo salvaje y Tg modelo de la EA .....</b>	<b>37</b>
<b>Animales adultos jóvenes .....</b>	<b>38</b>
Memoria de trabajo .....	38
Niveles de subunidades del RNMDA en hipocampo luego de una sesión de CA .....	40
Capacidad de formación de MLP .....	43
Niveles de subunidades del RNMDA en hipocampo luego de dos sesiones de CA .....	44
<b>Animales de 1 año .....</b>	<b>45</b>
Memoria de trabajo .....	46
Niveles de subunidades del RNMDA en hipocampo luego de una sesión de CA .....	47
Capacidad de formación de MLP .....	49
Niveles de subunidades del RNMDA en hipocampo luego de dos sesiones de CA .....	51
<b>Subunidades del RNMDA en un modelo <i>in vitro</i> luego de una estimulación repetida .....</b>	<b>52</b>
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>57</b>
<b>RNMDA y memoria .....</b>	<b>59</b>
<b>RNMDA y memoria en ratas de genotipo salvaje .....</b>	<b>60</b>
<b>RNMDA y memoria en ratas Tg modelo de la EA .....</b>	<b>62</b>
<b>Localización celular de los cambios en las subunidades del RNMDA en un modelo <i>in vitro</i> .....</b>	<b>66</b>
<b>Cambios similares de las subunidades del RNMDA en los distintos modelos experimentales .....</b>	<b>68</b>
<b>Relevancia de los resultados obtenidos .....</b>	<b>69</b>

## CAPÍTULO II

### Desarrollo de vectores virales neurotrópicos

<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>73</b>
---------------------------	-----------



<b>Vectores amplicón como herramientas para el estudio de las subunidades del RNMDA..</b>	<b>75</b>
<b>El virus herpes simplex tipo-1 .....</b>	<b>76</b>
<b>Vectores derivados del HSV-1 .....</b>	<b>78</b>
Vectores amplicón .....	79
<b>Vectores amplicón como una posible estrategia terapéutica contra la EA .....</b>	<b>82</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>85</b>
<b>Objetivos generales .....</b>	<b>87</b>
<b>Objetivos específicos .....</b>	<b>87</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>89</b>
<b>Diseño y construcción de plásmidos .....</b>	<b>91</b>
Estrategia general de clonado .....	91
PCR .....	95
Hibridación de oligonucleótidos .....	95
<b>Líneas celulares .....</b>	<b>95</b>
Mantenimiento de las líneas celulares .....	96
<b>Transfección de cultivos .....</b>	<b>96</b>
<b>Producción de vectores amplicón .....</b>	<b>97</b>
<b>Titulación de producciones de vectores amplicón .....</b>	<b>99</b>
<b>Infección de cultivos .....</b>	<b>100</b>
<b>Cirugías estereotáxicas .....</b>	<b>101</b>
<b>Evitación inhibitoria .....</b>	<b>102</b>
<b>Control de los posibles efectos de la cirugía, de la inyección estereotáxica y de los     vectores .....</b>	<b>103</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>105</b>
<b>Desrrollo de vectores amplicón para modificar la expresión de las subunidades GluN2A     y GluN2B.....</b>	<b>107</b>
<b>Construcción de plásmidos amplicón para modificar la expresión de las subunidades     GluN2A y GluN2B .....</b>	<b>108</b>
Plásmidos amplicón para modificar la expresión de la subunidad GluN2A .....	108
Plásmidos amplicón para modificar la expresión de la subunidad GluN2B .....	115
<b>Verificación de la expresión de los transgenes de interés .....</b>	<b>119</b>
Plásmidos para modificar la expresión de la subunidad GluN2B .....	119
Plásmidos para expresar las subunidades GluN2A y GluN2B .....	120

<b>Producción de vectores amplicón .....</b>	<b>121</b>
<b>Ensayos <i>in vitro</i> utilizando vectores amplicón .....</b>	<b>122</b>
Eficiencia de los vectores amplicón 2A(AS) <i>in vitro</i> .....	122
Eficiencia de los vectores amplicón 2B(AS) <i>in vitro</i> .....	125
<b>Ensayos <i>in vivo</i> utilizando vectores amplicón .....</b>	<b>126</b>
<b>Anexo: Desarrollo de vectores amplicón para expresar un scFv específico contra o<math>\beta</math>A ..</b>	<b>135</b>
Verificación de la expresión de los transgenes de interés .....	138
Producción de vectores amplicón .....	140
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>141</b>
<b>Desarrollo de vectores amplicón para modificar la expresión de subunidades regulatorias del RNMDA .....</b>	<b>143</b>
<b>Formación de memorias en animales inoculados con vectores AS contra GluN2A y GluN2B .....</b>	<b>145</b>
<b>Anexo: Desarrollo de vectores amplicón para expresar un scFv específico contra o<math>\beta</math>A ..</b>	<b>146</b>
<b>RESUMEN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES .....</b>	<b>151</b>
<b>Estudio de posibles cambios en los niveles de las subunidades del RNMDA en procesos relacionados con el aprendizaje y la memoria .....</b>	<b>153</b>
<b>Desarrollo de vectores virales de tipo amplicón para modificar la expresión de GluN2A y GluN2B .....</b>	<b>155</b>
<b>Desarrollo de una herramienta para neutralizar los o<math>\beta</math>A <i>in vivo</i> como posible terapia experimental contra la EA .....</b>	<b>156</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>S/N</b>

## **CAPÍTULO I**

Subunidades del RNMDA y memoria en ratas de  
genotipo salvaje y transgénicas modelo de la  
Enfermedad de Alzheimer

---



## INTRODUCCIÓN

---



## NEUROTRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA

El glutamato, un simple aminoácido, tiene funciones esenciales en el sistema nervioso; como neurotransmisor es transmitido de una neurona a otra a través de la sinapsis. La liberación de glutamato por una neurona -presináptica- está finamente regulada. Una vez liberado a la hendidura sináptica, el glutamato es detectado por los receptores de glutamato en la neurona adyacente -postsináptica-, formando la base de la neurotransmisión en muchas de las aproximadamente  $10^{14}$  sinapsis del cerebro humano (Kandel y col., 1995). Tanto en el cerebro como en la médula espinal, el aminoácido glutamato media la gran mayoría de la neurotransmisión excitatoria (ver Traynelis y col., 2010).

El glutamato actúa sobre varios receptores de membrana, incluyendo receptores ionotrópicos, que forman canales catiónicos; estos receptores pueden ser subdivididos en tres grandes familias: los receptores AMPA (RAMPA), los receptores de kainato y los receptores N-metil D-aspartato (RNMDA).

### RECEPTORES NMDA

Los RNMDA cumplen un rol central en la función del sistema nervioso central (SNC), ya que son mediadores de la plasticidad neuronal y sináptica, y son capaces de convertir patrones específicos de actividad neuronal en cambios de larga duración en la estructura y función sinápticas, que serían los mecanismos subyacentes a funciones cognitivas complejas.

Los RNMDA son canales iónicos activados por ligando que resultan inusuales ya que la mayoría se encuentra bloqueado por  $Mg^{2+}$ , por lo que su activación no sólo requiere de la unión de los dos agonistas (glutamato y glicina) (Johnson y Ascher, 1987), sino también de la liberación de mencionado bloqueo por  $Mg^{2+}$ , gracias a una despolarización concomitante de la membrana sináptica (Nowak y col., 1984; Wang y MacDonald, 1995). La apertura de los RNMDA da lugar a un importante influjo de  $Ca^{2+}$ , pudiendo incluir otros cationes, e inicia una cascada de transducción de señales con efectos relevantes en la neuroplasticidad. Los RNMDA están involucrados en la potenciación y en la depresión de larga duración (LTP y LTD, respectivamente) (Bliss y Collingridge, 1993; Lisman y McIntyre, 2001; MacDermott y col., 1986). Numerosos estudios indican que los distintos niveles de activación de los RNMDA y el nivel de ingreso de  $Ca^{2+}$  pueden dar lugar a distintos efectos en la sinapsis (Dovgan y col., 2010; Wickens, 1988). Bajos niveles de activación del receptor conducirían a una depresión sináptica, y niveles más elevados de su activación, a una potenciación sináptica (Cummings y col., 1996;

Yang y col., 1999). Por otro lado, niveles muy elevados de activación pueden conducir a daño y muerte celular (Ko y col., 1998).

Los RNMDA están involucrados fisiológicamente en plasticidad sináptica y neuronal, tanto durante el desarrollo como durante toda la vida, y están involucrados en procesos patológicos, como la epilepsia, episodios de isquemia y enfermedades neurodegenerativas (ver Paoletti y col., 2013; ver Zhou y Sheng, 2013).

Los RNMDA son proteínas intrínsecas de membrana que se consideran formadas por heterotetrámeros. Los distintos subtipos difieren en su composición de subunidades. Hasta el momento se han identificado 7 subunidades diferentes, que pueden clasificarse dentro de 3 subfamilias de acuerdo a las homologías de sus secuencias (Moriyoshi y col., 1991; Nakanishi y col., 1992; Hollmann y Heinemann, 1994; ver Traynelis y col., 2010; ver Paoletti y col., 2013):

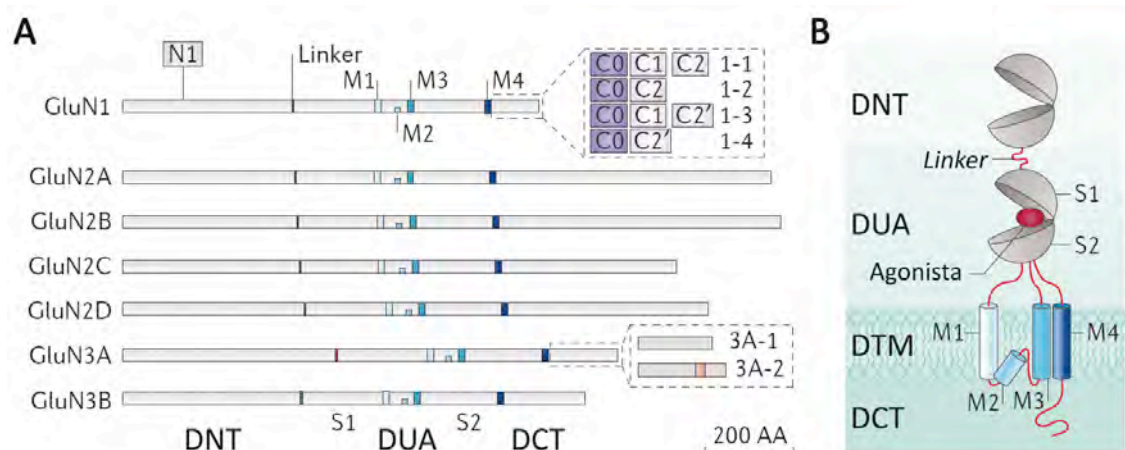
**GluN1:** codificada por un único gen. Presenta 8 isoformas por *splicing* alternativo:

GluN1a-4a y GluN1b-4b.

**GluN2(A-D):** codificadas por 4 genes distintos.

**GluN3(A-B):** codificadas por 2 genes distintos. Para GluN3A existen 2 variantes de *splicing* alternativo.

En la **Figura 1** se esquematizan las regiones codificantes y la estructura de los RNMDA.

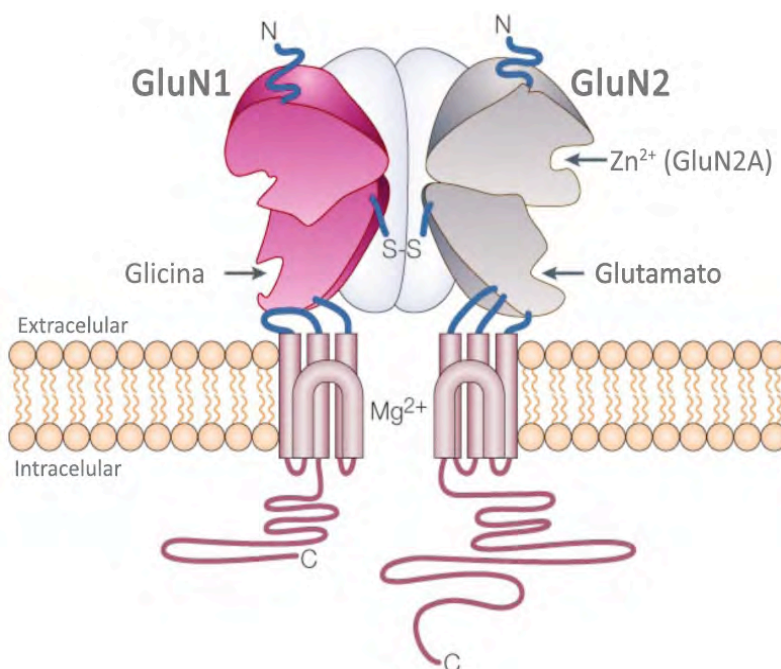


**Figura 1. Regiones codificantes y estructura de las subunidades del RNMDA.** Hasta el momento han sido identificadas 7 subunidades del RNMDA: GluN1, GluN2A-GluN2D y GluN3A y GluN3B. La heterogeneidad es mayor aún ya que las subunidades GluN1 y GluN3A presentan distintas variantes determinadas por *splicing* alternativo. En **A)** se esquematizan las secuencias codificantes y en **B)** la estructura de los RNMDA. DNT: dominio N-terminal; DUA: dominio de unión de agonistas. DCT: dominio C-terminal intracelular. M1-M4 indican segmentos de membrana. Figura adaptada de Paoletti y col. (2013).



Cada subunidad está compuesta por entre 900 y 1480 aminoácidos. La diferencia en el tamaño está determinada principalmente por la longitud del dominio carboxilo (C)-terminal, región que está involucrada en el transporte del receptor y que acopla el receptor a las cascadas de señalización.

Los RNMDA son heterotetrámeros compuestos por dos subunidades GluN1 siempre presentes junto con dos subunidades regulatorias. Mayormente, las subunidades regulatorias son GluN2, o una mezcla de subunidades GluN2 y GluN3. Las subunidades regulatorias contribuyen a determinar las propiedades fisiológicas y farmacológicas del receptor, como la intensidad del bloqueo por  $Mg^{2+}$ , que le confiere dependencia del voltaje (ver Clarke y Johnson, 2006). La incorporación diferencial de las subunidades GluN2 y GluN3 es la fuente más importante de diversidad funcional (Cull-Candy y Leszkiewicz, 2004; Paoletti, 2011; Traynelis y col., 2010). Las dos subunidades no-GluN1 pueden ser iguales o diferentes, dando lugar a los llamados receptores di- o tri-heteroméricos (Sheng y col., 1994), respectivamente. En la **Figura 2** se muestra un esquema de la estructura del RNMDA.



**Figura 2. Estructura del RNMDA.** Los RNMDA son proteínas de membrana heterotetráméricas compuestas por dos subunidades GluN1 y dos subunidades GluN2 y/o GluN3; en hipocampo predominan las subunidades regulatorias GluN2(A-B). El canal presenta un bloqueo por  $Mg^{2+}$ , dependiente de voltaje, que se libera con la despolarización de la neurona. La unión de glutamato y glicina produce la apertura del canal, permitiendo la entrada de  $Ca^{2+}$ . Figura adaptada de Witt y col. (2004).

La subunidad GluN1 se expresa ubicuamente en el SNC desde el estadio embrionario 14 (E14) hasta la adultez (Akazawa y col., 1994; Monyer y col., 1994; Watanabe y col., 1992), con diferencias en la expresión de las isoformas (Paoletti, 2011). La relevancia funcional de esta expresión diferencial es aún desconocida.

Las 4 subunidades GluN2, que son las determinantes más importantes de la heterogeneidad funcional del receptor, muestran perfiles de expresión espacio-temporal llamativamente diferentes (Akazawa y col., 1994; Monyer y col., 1994; Sheng y col., 1994). En la **Figura 3** se esquematiza la expresión de las subunidades del RNMDA a lo largo del desarrollo.



**Figura 3. Expresión de las subunidades del RNMDA a lo largo del desarrollo.** Perfil de expresión de las distintas subunidades del RNMDA en cerebro de ratón, a distintas edades: día del nacimiento (día post-natal 0, P0), dos semanas luego del nacimiento (P14) y en adultos. Figura adaptada de Paoletti y col. (2013).

En roedores, las subunidades del RNMDA GluN2B y GluN2D se expresan desde el período prenatal y predominan hasta las 2 semanas de vida, cuando comienzan a disminuir (Quinlan y col., 2004; Sheng y col., 1994), mientras que GluN2A y GluN2C aumentan luego del nacimiento. Inicialmente predominan las subunidades GluN2B y luego comienzan a aumentar las GluN2A, particularmente en el telencéfalo. Los cambios más importantes en los patrones de expresión de las subunidades GluN2 ocurren durante las dos primeras semanas de vida postnatal. La expresión de GluN2A comienza poco después del nacimiento y aumenta sostenidamente hasta expresarse amplia y abundantemente en prácticamente cada región del SNC en el adulto. Simultáneamente al progresivo aumento de la expresión de GluN2A, la expresión de GluN2D decae marcadamente y, en el adulto, se encuentra expresada en niveles bajos, mayormente en el diencefalo y el mesencéfalo. En marcado contraste con la expresión de GluN2D, los niveles de expresión de GluN2B se mantienen altos luego del nacimiento, llegando a su máximo nivel alrededor de la primera semana de vida postnatal; luego, la distribución de esta subunidad se restringe progresivamente al telencéfalo. La expresión de

GluN2C aparece tarde en el desarrollo, alrededor del día postnatal 10 (P10), y su expresión está principalmente confinada al cerebelo y bulbo olfatorio. Las subunidades GluN3A y GluN3B también presentan perfiles de expresión diferentes a lo largo de la ontogenia (Henson y col., 2010; Pachernegg y col., 2012). La expresión específica de las subunidades GluN2B, GluN2D y GluN3A, tempranamente en el desarrollo, sugiere fuertemente que estas subunidades podrían ser importantes para la sinaptogénesis y la maduración sináptica (Henson y col., 2010; Pachernegg y col., 2012).

En el SNC adulto, particularmente en estructuras del sistema límbico involucradas en funciones cognitivas y afectivas, como el hipocampo, la amígdala, la corteza cerebral parahipocámpica, entorrinal y prefrontal, predominan las subunidades GluN2A y GluN2B (Akazawa y col., 1994; Monyer y col., 1994; Watanabe y col., 1992).

Los RNMDA presentan propiedades remarcables que los distinguen de otros tipos de receptores ionotrópicos activados por ligando (Cull-Candy y Leszkiewicz, 2004; Paoletti, 2011; Traynelis y col., 2010). Como ya se mencionó, sus canales iónicos están sujetos a un bloqueo por  $Mg^{2+}$  dependiente de voltaje, son altamente permeables a  $Ca^{2+}$  y su activación requiere, además del desbloqueo, de la presencia de glutamato y del co-agonista glicina (o D-serina). Presentan cinética de apertura-cierre lenta (inusual) debido a que liberan lentamente el glutamato. Los RNMDA cuentan con varios sitios modulatorios que le confieren una sensibilidad exquisita al microentorno extracelular. Sus dominios C-terminal largos les permiten establecer una gran cantidad de interacciones intracelulares. Los subtipos de RNMDA presentan marcadas variaciones en sus propiedades biofísicas, farmacológicas y de señalización del receptor. Tanto la conductancia del canal, como el bloqueo por  $Mg^{2+}$  y la permeabilidad al  $Ca^{2+}$ , están influenciados por la composición en subunidades. La identidad de la subunidad GluN2 también es determinante de varias propiedades de apertura, incluyendo la máxima probabilidad de apertura del canal, la sensibilidad a los agonistas y la cinética de desactivación. Los subtipos de RNMDA conteniendo GluN2A y GluN2B se caracterizan por una fuerte dependencia del voltaje (requieren de una elevada despolarización para que se libere el bloqueo por  $Mg^{2+}$ ), lento decaimiento y alta conductancia al  $Ca^{2+}$ ; sin embargo, los RNMDA-GluN2B presentan mayor afinidad por la calcio-calmodulina quinasa II (CaMKII), apertura más prolongada del canal y mayor capacidad de carga que los RNMDA-GluN2A (Strack y Colbran, 1998; ver Yashiro y Philpot, 2008). El subtipo de RNMDA conteniendo subunidades GluN2A (RNMDA-GluN2A) presenta mayor probabilidad de apertura del canal que el receptor

conteniendo GluN2B-D (RNMDA-GluN2(B-D)). Sin embargo, los RNMDA-GluN2A presentan más baja sensibilidad tanto a glutamato como a glicina (Vicini y col., 1998).

## **RNMDA Y MEMORIA**

En estructuras del SNC involucradas en procesamiento de funciones cognitivas están presentes predominantemente RNMDA conteniendo GluN2A y/o GluN2B (Lee y Kesner, 2002). Hay discrepancia en cuanto a la participación que se le atribuye a los subtipos de RNMDA del hipocampo en la adquisición y consolidación de memorias, así como en plasticidad sináptica, y también acerca de su relación con la transmisión GABAérgica y con la transmisión colinérgica, que está también involucrada en funciones cognitivas.

Desde la propuesta de la hipótesis "RNMDA-LTP" por Richard Morris, involucrando directamente a los RNMDA en plasticidad sináptica, y a ésta como base del establecimiento de una memoria (Morris y col., 1986) en el marco de la "Teoría sináptica de la memoria", la relación de los RNMDA con la plasticidad sináptica y la memoria (ver Yashiro y Philpot, 2008) ha sido intensamente estudiada (Cercato y col., 2014; Lau y Zukin, 2007; Tsien y col., 1996). En estudios comportamentales en ratas, la aplicación intra-hipocampo o intra-amígdala del antagonista del RNMDA APV produjo amnesia en la tarea de evitación inhibitoria (Izquierdo y col., 1992; Jerusalinsky y col., 1992). Los agonistas del RNMDA, en cambio, favorecieron el proceso de consolidación de memorias (ver Izquierdo y Medina, 1995; Izquierdo y col., 1992). Ratones modificados genéticamente con *knock-out* (KO) de GluN1 en estadios postnatales, predominantemente en las células piramidales de la región CA1, presentaron un desarrollo aparentemente normal pero mostraron déficits severos en la versión espacial del Laberinto Acuático de Morris (LAM) (Tsien y col., 1996). En registros electrofisiológicos *in vivo* de las células piramidales de la región CA1, se observó que las *place cells* registradas en estos ratones presentaban propiedades alteradas cuando los animales atravesaban una trayectoria lineal (McHugh y col., 1996). Además, la inducción *in vitro* de la LTP fue bloqueada específicamente en las sinapsis entre las fibras colaterales de Schaffer y las células piramidales de la región CA1. En estos ratones, la eliminación del gen GluN1 estuvo retrasada hasta alrededor de la tercera semana postnatal, y se vio restringida principalmente a las células piramidales de la región CA1 hasta alrededor de los 2 meses de edad (Fukaya y col., 2003). Sin embargo, a partir de la tercera semana podrían haber ocurrido alteraciones en el desarrollo por la falta de expresión de GluN1; también, luego del segundo mes los animales tuvieron una eliminación más

extendida del gen GluN1, y los ratones mostraron niveles alterados de GluN1 en hipocampo y también en regiones adyacentes, incluyendo zonas de la corteza cerebral.

En nuestro laboratorio se ha comprobado que antagonistas relativamente selectivos para GluN2B facilitaron la consolidación de memorias (Cercato y col., 2014; Cheli, 2006). Dalton y col. (2012) demostraron que el bloqueo de los RNMDA-GluN2A por el antagonista NVP perjudicó tanto la LTP en rodajas de amígdala como la adquisición de una memoria de condicionamiento del miedo. Sin embargo, NVP no afectó la LTD ni la extinción de la memoria de condicionamiento del miedo. Por otro lado, demostraron que el bloqueo de los RNMDA conteniendo GluN2B (RNMDA-GluN2B) por el antagonista Ro25-6981 impidió la LTD en rodajas de amígdala y el aprendizaje de la extinción de la memoria condicionada por el miedo, mientras que no tuvo efecto en la inducción de LTP ni en la adquisición de la memoria condicionada por el miedo. Estos resultados evidencian el rol diferencial de los RNMDA-GluN2A en la LTP y de los RNMDA-GluN2B en la LTD (Dalton y col., 2012). Se ha sugerido que la inducción de LTD por estimulación de baja frecuencia requeriría un incremento de los RNMDA-GluN2B y una disminución de los RNMDA-GluN2A en el *pool* sináptico, como fue demostrado en ratones KO para GluN2B (Brigman y col., 2010).

Por otro lado, se ha demostrado que la expresión de las subunidades del RNMDA podía ser modificada en adultos por la exposición prolongada a agentes estresantes (Krugers y col., 1993) o la administración de corticosterona (Gourley y col., 2009; Kamphuis y col., 2003; Tse y col., 2011).

En rodajas de hipocampo de ratas peri-puberales se ha observado que el tipo de receptores glutamatérgicos (RNMDA o RAMP) potenciados durante el establecimiento, de la LTP está determinado por el grado de activación de los RNMDA durante la estimulación tetánica (Aniksztejn y Ben-Ari, 1995). Por otra parte, en cultivos organotípicos de hipocampo de neonatos (P6-7), se observó aumento del nivel de GluN2A en membranas dendríticas luego de la inducción de plasticidad, sugiriendo un reemplazo de RNMDA-GluN2B por RNMDA-GluN2A, que requeriría de actividad sináptica (Barria y Malinow, 2002). Grosshans y col. (2002) observaron que, luego de la inducción de LTP, se producía un incremento rápido y persistente (hasta 3 h) de las subunidades GluN1 y GluN2A, pero no de GluN2B, en dendritas de rodajas de hipocampo de ratas adultas, con una disminución concomitante de los niveles intracelulares de dichas subunidades 30 min luego de la inducción de LTP. Estos cambios en la composición de los RNMDA fueron atribuidos a un intercambio dinámico entre los *pools* no sinápticos y/o extra-sinápticos, y el *pool* sináptico, ya que no se evidenciaron cambios en los niveles totales

del RNMDA (Grosshans y col., 2002). A partir de ensayos electrofisiológicos realizados en rodajas de hipocampo de ratas neonatas, se ha inferido que hay un incremento rápido (menos de un seg) de GluN2A en la superficie celular luego de la inducción de LTP. Este incremento fue atribuido a movilidad lateral de los RNMDA-GluN2A desde un *pool* extrasináptico hacia la superficie celular (Bellone y Nicoll, 2007). Matta y col. (2011) demostraron que el cambio en la composición de subunidades GluN2 durante la LTP depende de actividad (Matta y col., 2011). Recientemente, se ha demostrado que la traducción local y el ensamblado de nuevos RNMDA-GluN2A también podrían estar involucrados en este proceso; estos eventos fueron observados cerca de los 60 min luego de la inducción de plasticidad por glicina (Swanger y col., 2013), NMDA (Udagawa y col., 2012) o pulsos de KCl (Baez y col., 2013). Para una revisión detallada de la regulación de la expresión de las subunidades del RNMDA y su implicancia en la LTD, la LTP y la metaplasticidad, ver la revisión de Yashiro y Philpot (ver Yashiro y Philpot, 2008).

Henderson y col. (2012) reportaron un aumento en los niveles de GluN1 y GluN2A en corteza cerebral de ratas adultas, 1 y 3 semanas después del entrenamiento en una tarea de destreza motora (Henderson y col., 2012). Pero, fuera de este antecedente, poco se sabe acerca de la expresión de las subunidades del RNMDA en animales adultos luego de una experiencia comportamental.

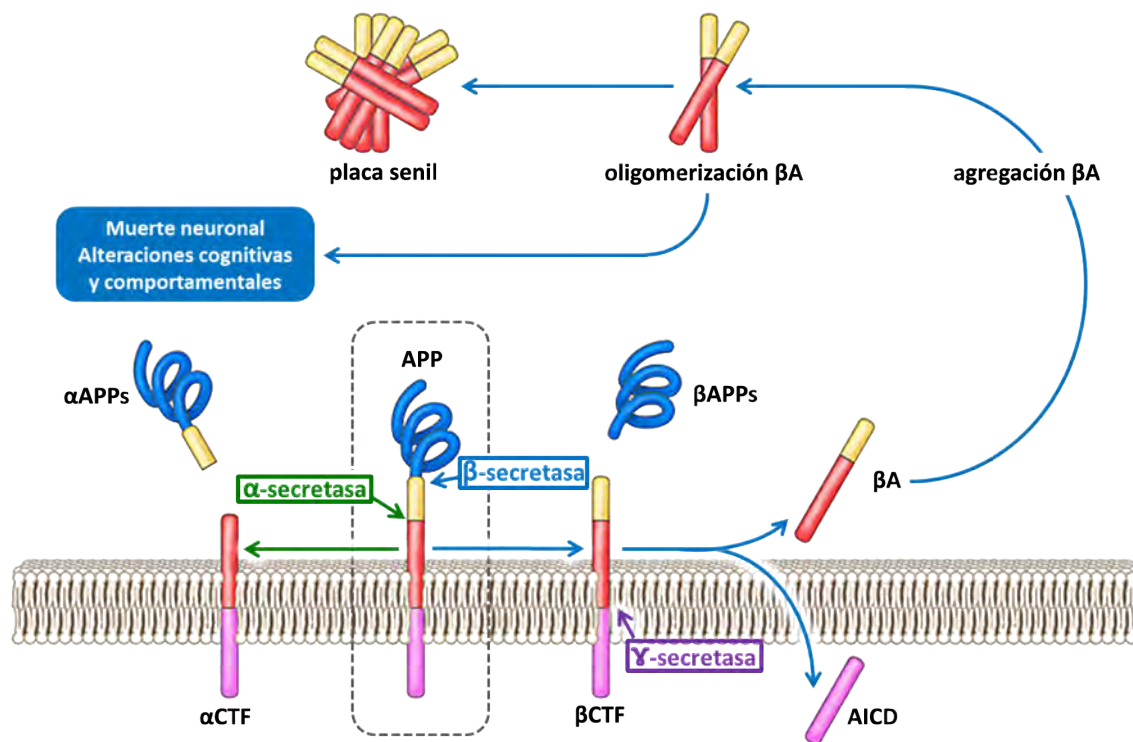
Entonces, nos propusimos desarrollar vectores virales neurotrópicos para modificar la expresión de las subunidades regulatorias GluN2A y GluN2B del RNMDA en hipocampo, como herramientas para investigar el rol de dichas subunidades en la formación de memorias dependientes de hipocampo en ratas inoculadas con los vectores construidos.

## **RNMDA Y ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa y representa la principal causa de deterioro cognitivo y demencia en individuos añosos. La neuropatología es compleja e incluye inflamación cerebral, estrés oxidativo neuronal, pérdida de sinapsis y degeneración de poblaciones neuronales específicas (Terry y col., 1999). En la EA es característico el aumento de péptidos  $\beta$ -amiloides ( $\beta$ A) generados a partir de la proteína precursora del amiloide (APP), que se agregan formando oligómeros de solubles ( $\alpha\beta$ A o ADDL), cuyo depósito insoluble forma luego las placas seniles, presentes principalmente en la corteza y el hipocampo de pacientes con EA (Glennner y Wong, 1984; Masters y col., 1985).

La “hipótesis amiloide” (Hardy y Selkoe, 2002) propone que una alta concentración extracelular de  $\beta$ A sería responsable del deterioro cognitivo en la EA. Éste fue uno de los modelos más ampliamente aceptados para la fisiopatología que subyace a la EA. En medio acuoso, el  $\beta$ A sintético se auto-asocia espontáneamente, formando agregados fibrilares semejantes a los encontrados en las placas seniles de los cerebros de pacientes con EA. Las fibras formadas por el péptido  $\beta$ A son neurotóxicas, mientras que el  $\beta$ A monomérico no lo es (Burdick y col., 1992; Hilbich y col., 1991; Lorenzo y Yankner, 1994; Pike y col., 1991). Hay conspicua evidencia que indica que el  $\beta$ A está involucrado de forma causal en la patogénesis de la EA; dicha evidencia proviene de un gran número de estudios *in vitro* e *in vivo*, incluyendo modelos animales de EA y cerebros de individuos afectados por la EA analizados *post-mortem*. En la última década se han acumulado evidencias indicando que los o $\beta$ A -y no las fibras amiloides insolubles (que también se originan por agregación del péptido)- serían las principales neurotoxinas responsables de la disfunción sináptica y de la pérdida de memoria en las fases iniciales de la EA (Ferreira y Klein, 2011; Ferreira y col., 2007; Klein, 2006). Los o $\beta$ A se encuentran en concentración elevada en cerebro y líquido cefalorraquídeo de pacientes con EA (Georganopoulou y col., 2005; Gong y col., 2003; Shankar y col., 2008) y de ratones transgénicos (Tg) modelos de EA (Lesné y col., 2006). Los o $\beta$ A se unen a la superficie neuronal, particularmente a las espinas dendríticas (Decker y col., 2010a; Lacor y col., 2007, 2004). Se ha demostrado que los o $\beta$ A inducen patología asociada a la EA. Se ha evidenciado pérdida/aberración de espinas dendríticas (Lacor y col., 2007), internalización de receptores (De Felice y col., 2007; Zhao y col., 2008), hiperfosforilación de la proteína asociada a microtúbulos Tau (De Felice y col., 2008), estrés oxidativo (De Felice y col., 2007) e inhibición del tráfico axonal (Decker y col., 2010b). Posiblemente, como consecuencia del ataque a las sinapsis, los o $\beta$ A indujeron inhibición de la LTP (Jürgensen y col., 2011; Lambert y col., 1998; Walsh y col., 2002) y déficits comportamentales (Brouillette y col., 2012; Lesné y col., 2006), recapitulando los síntomas de la EA.

La APP se expresa constitutivamente en la superficie neuronal, donde puede ser clivada normalmente por una  $\alpha$ -secretasa para formar  $\alpha$ APPs (soluble) y el fragmento  $\alpha$ CTF como parte de la cascada no amiloidogénica. En la vía amiloidogénica, la APP sería internalizada en endosomas y luego sería clivada por la  $\beta$ -secretasa BACE, produciendo los fragmentos  $\beta$ AAPs (solubles) y el  $\beta$ CTF. Este último puede ser clivado por una  $\gamma$ -secretasa (por ejemplo, por el complejo que contiene a la presenilina-1), liberando el péptido  $\beta$ A y el AICD. Los endosomas de reciclado llevan su carga hasta los cuerpos multivesiculares, desde donde los péptidos  $\beta$ A son transportados hacia distintos destinos intracelulares pudiendo, por



**Figura 4. Procesamiento secuencial de la APP.** La APP, situada en la membrana neuronal, es clivada de forma secuencial. En la vía no amiloidogénica, la APP es clivada por la α-secretasa y luego por la γ-secretasa, generando péptidos inofensivos. En la vía amiloidogénica, el clivaje secuencial de la APP por la β-secretasa y luego por la γ-secretasa, libera un péptido β-amiloide (βA) que, al acumularse, se agrega y oligomeriza, formando finalmente las placas seniles. Los oligómeros βA producen importantes alteraciones a nivel neuronal y comportamental. Figura adaptada de Gandy (2005).

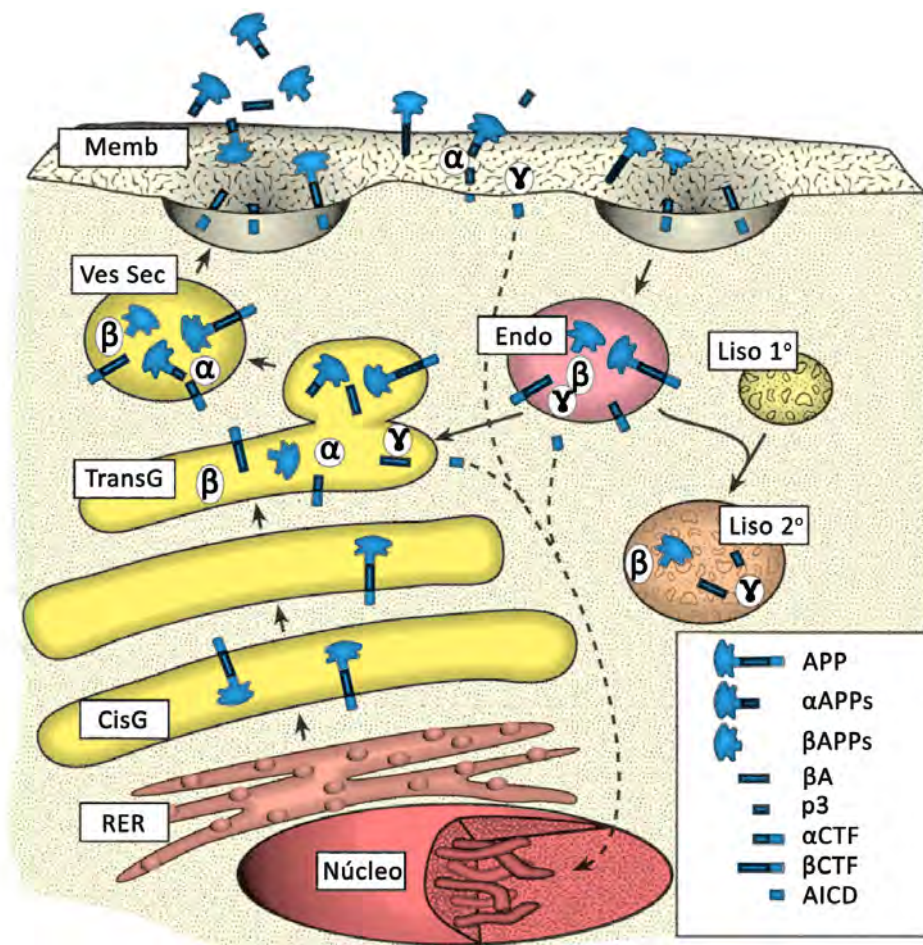
ejemplo, ser secretados. En una vía alternativa, los péptidos βA pueden reciclarse a través del aparato de Golgi o ser degradados en lisosomas. Los péptidos βA secretados pueden formar oβA (solubles), luego fibrillas y finalmente, depósitos insolubles conocidos como placas seniles (ver Rivest, 2009, Turner y col., 2003). Los βA pueden ser generados en la vía de endosomas de reciclado, en la vía secretoria y en el retículo endoplasmático (Sisodia y St George-Hyslop, 2002). En la **Figura 4** se esquematiza el procesamiento secuencial de la APP y, en la **Figura 5**, los posibles sitios de procesamiento.

Los oβA son actualmente considerados las neurotoxinas responsables de la disfunción sináptica y de la pérdida de memoria de los estadíos iniciales de la EA (Collingridge y Singer, 1990; ver Ferreira y Klein, 2011; ver Ferreira y col., 2007; ver Klein, 2006).

En teoría, hay varios roles potenciales para los RNMDA en los mecanismos relacionados con βA, como propusiera Malinow (2012): primero, el RNMDA podría ser una receptor para βA -o podría asociarse indirectamente-, interactuando con moléculas que unen βA; segundo, los



RNMDA podrían ser necesarios, tanto mediando como actuando permisivamente en las acciones de los  $\beta$ A en la transmisión sináptica y la plasticidad; tercero, el RNMDA podría ser un importante blanco río abajo de los  $\beta$ A, lo cual implica que los  $\beta$ A podrían causar un aumento o una reducción en la función del RNMDA; y cuarto, la actividad del RNMDA podría controlar la formación de los  $\beta$ A (Malinow, 2012). Tanto nuestro equipo como otros investigadores (De Felice y col., 2007; Decker y col., 2010a, 2010b; Kawamoto y col., 2008; Klein y col., 2004; Shankar y col., 2008, 2007), hemos estudiado los RNMDA como posibles blancos de los  $\beta$ A, reforzando la hipótesis de que la unión de los  $\beta$ A aumentaría el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  por los mismos



**Figura 5. Posible sitios de procesamiento de la APP en neuronas.** Luego de la traducción en el retículo endoplásmico rugoso (RER), la APP es transportada a través del Golgi hacia la membrana plasmática (Memb). La APP y los fragmentos C-terminal son reinternalizados a través del sistema endosomal y direccionados al trans-Golgi (TransG) o son incorporados en lisosomas secundarios (Liso 2°) para su degradación (flechas sólidas). Los fragmentos C-terminal son procesados liberando el dominio intracelular de la APP (AICD), que puede modular la transcripción génica en el núcleo (flechas rayadas). La  $\alpha$ -secretasa ( $\alpha$ ) actúa en la superficie celular, en las vesículas secretoras y en el trans-Golgi. La  $\beta$ -secretasa ( $\beta$ ) actúa en las vesículas secretoras (Ves Sec), en los endosomas (Endo) y en los lisosomas; su actividad en la superficie celular es incierta. La localización de la  $\gamma$ -secretasa ( $\gamma$ ) es controversial y probablemente dependa del tipo celular, pero se encuentra usualmente en la red del trans-Golgi y en los endosomas/lisosomas. CisG, Cis-Golgi; Liso 1°, lisosoma primario. Figura adaptada de Turner y col. (2003).

receptores, provocando una “ganancia de función” (De Felice y col., 2007) e induciendo eventos que alterarían el rol fisiológico de los RNMDA. En una colaboración con el equipo de Sergio Ferreira (UFRJ, Brasil) y nuestro laboratorio, se demostró que la presencia del RNMDA en las sinapsis excitatorias constituye un requisito para la interacción patogénica entre los  $\alpha\beta$ A y la sinapsis (Decker y col., 2010a). Esa unión dispararía la patología asociada a la EA, interfiriendo, entre otras cosas, con las funciones del RNMDA, produciendo disrupción de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  (Kelly y Ferreira, 2006), aumento del estrés oxidativo (De Felice y col., 2007; Decker y col., 2010a) y déficits en la LTP (Dewachter y col., 2009), con posterior disminución del RNMDA en la superficie neuronal. Entre otras alteraciones, el incremento de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y del estrés oxidativo (De Felice y col., 2007) daría lugar a hiperfosforilación de Tau (De Felice y col., 2008), inhibición del tráfico axonal (Decker y col., 2010b), pérdida de espinas dendríticas (Decker y col., 2010a) y, en última instancia, a la muerte celular (Gandy, 2005; ver Selkoe, 2001; ver Tanzi y Bertram, 2001). Aquellas alteraciones que producen desde un comienzo disfunción sináptica y neuronal, darían lugar a los déficits comportamentales (ver Ferreira y Klein, 2011; ver Ferreira y col., 2007; ver Klein, 2006). Aunque ha sido propuesta una participación diferencial de subtipos de RNMDA en la unión y en los efectos deletéreos instigados por los  $\alpha\beta$ A, aún quedan varios interrogantes por responder (Ferreira y col., 2012; ver Ferreira y Klein, 2011; Shankar y col., 2008).

Existen muchos modelos de roedores Tg, principalmente ratones (ver Do Carmo y Cuello, 2013). En particular, hay un modelo Tg de la EA en ratón (Lacor y col., 2004; Lesné y col., 2006) ampliamente utilizado, y uno desarrollado recientemente en rata (Leon y col., 2010), ambos expresando la APP humana con mutaciones producen un incremento de la concentración del  $\beta$ A, como las que se encuentran en algunas formas familiares de la EA.

Las ratas Tg McGill-Thy1-R-APP (Leon y col., 2010) expresan la APP humana con dos mutaciones (Swedish e Indiana) frecuentes en la EA familiar. Estos animales desarrollan una acumulación progresiva de  $\beta$ A intraneuronal, con un fenotipo que se establece a los 3 meses de edad, edad a la que los homocigotas ya presentan deterioro cognitivo. A partir de los 6 meses en los homocigotas se observan depósitos amiloides extracelulares y deterioro cognitivo (evaluado en el LAM). A los 13 meses, el deterioro cognitivo es prominente y correlaciona positivamente con los niveles de  $\beta$ A soluble en corteza en homocigotas. Los animales hemicigotas muestran menor deterioro cognitivo que los homocigotas, sugiriendo una interferencia dosis-dependiente de los  $\alpha\beta$ A en la función sináptica. Esta característica resulta de gran interés para el estudio de etapas tempranas de la EA con la ventaja de que, al

ser un modelo en rata, existe una gran variedad de pruebas comportamentales disponibles. De esta manera, la rata Tg McGill-Thy1-R-APP reproduce una patología similar a la observada en la EA, constituyendo, al presente, uno de los mejores modelos animales disponibles para el estudio de esta enfermedad.

Nos propusimos entonces estudiar posibles cambios en los niveles de las subunidades del RNMDA en procesos relacionados con el aprendizaje y la memoria por exposición a un campo abierto (CA) de ratas Wistar de genotipo salvaje (Control) adultas jóvenes y de 1 año de edad, con el fin de establecer características que pudieran tener relación con la edad. Por otro lado, evaluamos ratas Tg modelo de la EA adultas jóvenes y de 1 año de edad, con el fin de discriminar características que pudieran tener relación con la edad o con el grado de avance de la patología. Por último, investigamos los posibles mecanismos celulares involucrados en los fenómenos observados, empleando un modelo *in vitro*.

Nos propusimos desarrollar vectores virales neurotrópicos para modificar la expresión de las subunidades GluN2A y GluN2B, como herramientas para el estudio del rol de dichas subunidades en los procesos de aprendizaje y memoria. En el Capítulo II (página 71) se detalla el desarrollo de los vectores amplicón y el estudio de la formación de memorias en animales inoculados con dichos vectores.

Por último, nos propusimos desarrollar una herramienta para atenuar los efectos deletéreos de los o $\beta$ A *in vivo* a través de la expresión de un anticuerpo monocatenario (scFv), específico contra o $\beta$ A, en los sitios de producción y/o acumulación de dichos oligómeros, como una posible terapia experimental contra la EA. Este tema se detalla en el Anexo del Capítulo II (página 135).



## OBJETIVOS

---



## OBJETIVOS GENERALES

El plan general del Laboratorio de Neuroplasticidad y Neurotoxinas consiste en estudiar la participación de la neurotransmisión colinérgica y la glutamatérgica centrales en plasticidad sináptica y en el procesamiento del aprendizaje y la memoria. Se investigan las funciones de ambos sistemas y su interacción, con un abordaje neuroquímico, de biología molecular, comportamental y electrofisiológico.

Los objetivos generales de este trabajo de Tesis fueron (1) estudiar el rol de subtipos de receptores NMDA (RNMDA) en diferentes procesos relacionados con el aprendizaje y la memoria, tanto en condiciones “normales” como en un modelo de la enfermedad de Alzheimer (EA), en animales adultos jóvenes y en animales de 1 año; (2) desarrollar vectores amplicón que nos permitieran modificar la expresión de las subunidades regulatorias del RNMDA GluN2A y GluN2B, predominantes en estructuras relacionadas con procesamiento de la memoria, como el hipocampo, para profundizar en el rol de esas subunidades en la formación de memorias; y por otra parte, nos propusimos 3) desarrollar vectores amplicón que expresaran un anticuerpo monocatenario (scFv), específico contra oligómeros del péptido  $\beta$ -amiloide ( $\text{o}\beta\text{A}$ ), como una posible estrategia experimental contra la EA.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

### **1. Estudiar posibles cambios en los niveles de las subunidades del RNMDA en procesos relacionados con el aprendizaje y la memoria.**

- a. Evaluar el nivel de las subunidades del RNMDA en hipocampo luego de la habituación a un campo abierto (CA):
  - i. en “condiciones normales” en ratas Wistar de genotipo salvaje (Controles) adultas jóvenes y de 1 año de edad, con el fin de discriminar características que pudieran tener relación con la edad.
  - ii. en “condiciones patológicas” en ratas transgénicas (Tg) modelo de la EA: ratas McGill-R-Thy1-APP, que expresan el gen de la proteína precursora del amiloide (APP) humana conteniendo las mutaciones *Swedish* e *Indiana* (Leon y col., 2010), en animales adultos jóvenes y de 1 año de edad, con el fin de discriminar características que pudieran tener relación con la edad o con el grado de avance

de la patología.

- b. Estudiar en un modelo *in vitro* los posibles mecanismos involucrados a nivel celular en los fenómenos observados.

**2. Desarrollar vectores virales de tipo amplicón para enviar genes al SNC con el fin de modificar la expresión de las subunidades regulatorias GluN2A y GluN2B del RNMDA.**

- a. Desarrollar vectores amplicón eficientes para expresar y para disminuir la expresión de las subunidades GluN2A y GluN2B.
- b. Investigar el rol de las subunidades GluN2A y GluN2B en la formación de memorias dependientes de hipocampo, en ratas inoculadas con los vectores amplicón desarrollados para producir el *knock-down* (KD) de cada subunidad, y verificar la eficiencia de la infección con dichos vectores para producir el KD de las subunidades GluN2A y GluN2B en el hipocampo de las ratas inoculadas.

**3. Desarrollar una herramienta que permita atenuar los efectos deletéreos de los o $\beta$ A *in vivo* como una posible terapia experimental contra la EA.**

- a. Desarrollar vectores amplicón que expresen un scFv, específico contra o $\beta$ A, en los sitios de producción y/o acumulación de dichos oligómeros, para evitar o disminuir los efectos deletéreos desencadenados por la unión de o $\beta$ A a neuronas.



## MATERIALES Y MÉTODOS

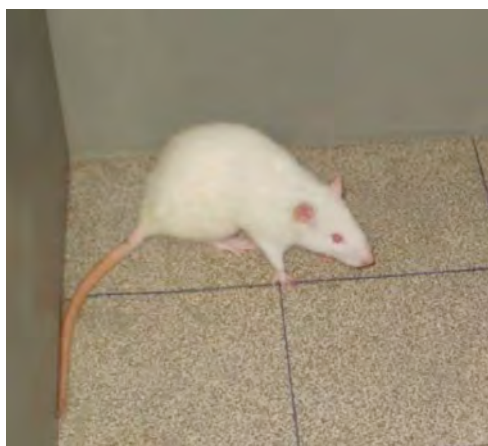
---



## ANIMALES

### Sujetos experimentales

En el desarrollo de esta Tesis trabajamos con ratas Wistar (*Rattus norvegicus* variedad albina cepa Wistar) de genotipo salvaje y con ratas Wistar transgénicas (Tg) cepa McGill-R-Thy1-APP (Leon y col., 2010). En la **Figura 6** se muestra una fotografía de una rata Wistar adulta de genotipo salvaje.



**Figura 6. Rata Wistar.** Los sujetos experimentales utilizados fueron ratas Wistar de genotipo salvaje y ratas Wistar cepa McGill-R-Thy1-APP.

Los animales fueron criados en la Sala de Animales de Experimentación del Instituto de Biología Celular y Neurociencia (CONICET-UBA), Argentina, con un ciclo de luz-oscuridad invertido, es decir, con luces encendidas de 20:00 h a 8:00 h. De este modo, los animales se encuentran en su período natural de vigilia, en la oscuridad, durante las horas en las que se realizan los ensayos comportamentales.

Todos los protocolos experimentales utilizados se realizaron de acuerdo a las normas y cuidados indicados por *National Institutes of Health Guide of the Care and Use of Laboratory Animals*, que fueron aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires (CICUAL).

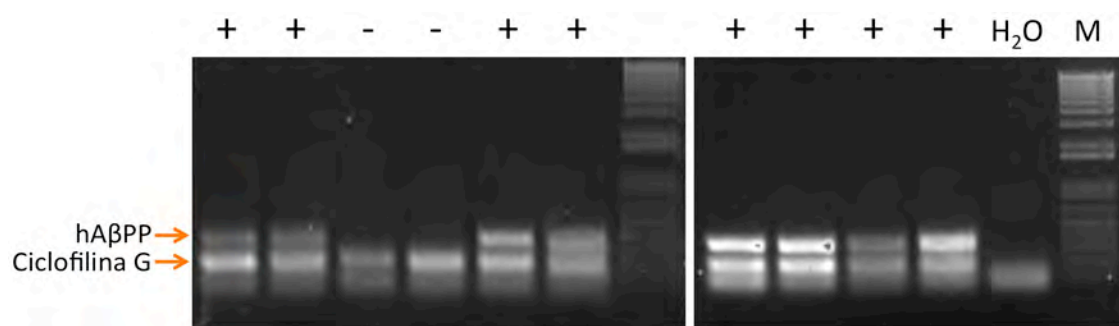
### Genotipificación

La genotipificación se realiza a partir de ADN extraído a partir de tejido obtenido por biopsia de una pequeña muestra de la oreja de cada animal. Para la extracción del ADN, el

tejido se digiere por incubación a 55 °C durante la noche (ON) en 100 µl de *buffer* de lisis (SDS 1%, EDTA 10 mM, Tris pH 7.5 50 mM, NaCl 100 mM) con el agregado de proteinasa K (concentración final 1 ml/ml). Se centrifuga 1 min a 3000 g y se pasa la fase superior acuosa a un nuevo tubo. Se agrega 1/10 del volúmen de acetato de sodio 3 M (pH 5.2) y 2 volúmenes de etanol 100 % frío, y se mezcla suavemente. Se incuban los tubos a -80 °C por 40 min y luego se centrifuga a 13000 rpm durante 10 min. Se descarta el sobrenadante (SN) y se lava el pellet de ADN con 1/2 volumen de etanol 70 %. Se centrifuga a 13000 rpm por 10 min, se descarta el SN y se seca el *pellet* por incubación a TA por 5 min. El ADN se resuspende en 40 µl de agua bidestilada estéril y se conserva a -20 °C.

Las muestras de ADN fueron analizadas por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple, utilizando cebadores (*primers*) específicos para el transgén (proteína precursora del β-amilode humano, hAβPP) FW: 5'-AGGACTGACCACTCGACCAG-3' y RV: 5'-CGGGGGTCTAGTTC TGCAT-3', para el control de carga (ciclofilina G) FW: 5'-TACAACAGTAGAACAAGGGAGCGAAG-3' y RV: 5'-ATCCCTCCTTCTTCTCCTCTATCTTTAC-3'. Programa de termociclado: 95 °C por 15 min, seguido por 40 ciclos (94 °C por 30 seg, 54 °C por 1 min, 72 °C por 1 min) y una fase de extensión final a 72 °C por 2 min. Las muestras se mantuvieron a 4 °C hasta su procesamiento. Los productos de PCR se resolvieron por electroforesis en gel de agarosa 2% con bromuro de etidio en buffer TBE y se visualizaron utilizando un transiluminador (Bio-Rad).

En la **Figura 7** se muestran dos corridas electroforéticas representativas de la genotipificación. Se indica con flechas el tamaño esperado para los productos de PCR del transgén hAβPP (387 pb) y la ciclofilina G (248 pb).



**Figura 7. Migraciones electroforéticas en geles de agarosa representativas de la genotipificación.** Migraciones electroforéticas de productos de PCR en geles de agarosa 2%, visualizadas por transiluminación. Se denominó Tg (+) a los animales cuyas muestras presentaron una banda del tamaño esperado para el producto de PCR correspondiente al hAβPP (387 pb). Los animales cuyas muestras no presentaron dicha banda fueron denominados de genotipo salvaje (-). Para la calle correspondiente al control negativo (H<sub>2</sub>O), no se observan bandas ni a la altura del hAβPP ni a la altura de la ciclofilina G. M, marcador de peso molecular 1 kb plus DNA ladder (Life Technologies).

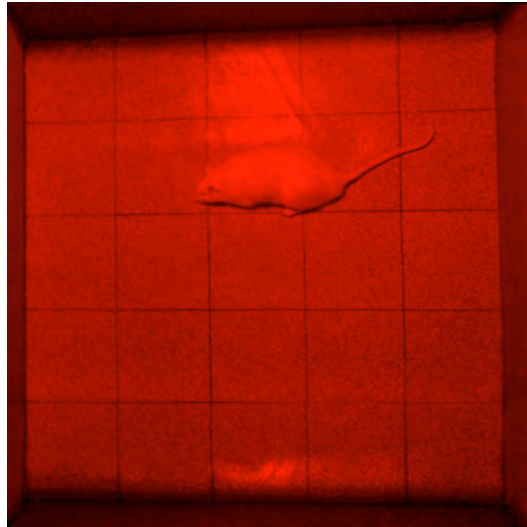
## CAMPO ABIERTO

La habituación es el aprendizaje más elemental y sencillo, de tipo no-asociativo, en el que se produce un cambio en el comportamiento como resultado de la exposición a un único estímulo. Se expresa comportamentalmente como una disminución de la respuesta ante la presentación repetida de un estímulo. La habituación es un mecanismo fundamental en la adaptación de un organismo a su ambiente, ya que contribuye a organizar las respuestas comportamentales ante la gran cantidad de estímulos existentes en el ambiente, sobre todo frente a aquellos estímulos que resulten irrelevantes.

El paradigma del CA permite evaluar, entre otros parámetros, el comportamiento exploratorio a través de la locomoción medida como cruzamientos de cuadrantes dibujados en el suelo (exploración horizontal), las elevaciones en postura bípeda y olfateos con la cabeza hacia arriba (*rearings*; exploración vertical) y los acicalamientos (*groomings*). En base a estos parámetros se puede evaluar la discriminación de un ambiente novedoso y la habituación al ambiente (reconocimiento y formación de memorias con componentes espaciales), a partir de la modificación de la actividad exploratoria a medida que el animal se habitúa al ambiente.

Los animales se exponen a una sesión de CA de 5 min de duración y se cuantifican los cruzamientos y las elevaciones realizadas por min. La comparación de estos parámetros min a min permite evaluar la MT de habituación a un ambiente novedoso. Si a las 24 h se realiza una segunda exposición al mismo CA, se puede comparar el total de cruzamientos, de elevaciones y de acicalamientos realizados en las dos sesiones para evaluar la habituación a largo plazo (formación de MLP de habituación). La disminución en la respuesta comportamental de exploración, ante la presentación reiterada (o prolongada) del estímulo (ambiente novedoso), indica que el animal se ha habituado a ese ambiente. En general, los parámetros más sensibles que se registran en los roedores son el número de elevaciones sobre las patas traseras (exploración vertical) y el número de cruzamientos (exploración horizontal). El número de acicalamientos y el tiempo dedicado a esta actividad pueden no variar o incluso aumentar (Thiel y col., 1998).

Arena: se utiliza una caja de madera de 60 cm x 60 cm, con una altura de 50 cm, fabricada en nuestro laboratorio de acuerdo a las especificaciones clásicas (Eilam, 2003; Prut y Belzung, 2003) con 25 cuadrantes de 12 cm x 12 cm cada uno. Los ensayos comportamentales se realizan con luz roja de baja intensidad (40 watts). En la **Figura 8** se muestra una fotografía de una rata en la arena del CA.



**Figura 8. Arena del campo abierto.** Se coloca al animal en una caja de madera de 60 cm x 60 cm, con una altura de 50 cm, que presenta una grilla marcada en el piso delimitando 25 cuadrantes de 12 cm x 12 cm cada uno. Para los animales criados en ciclo de luz invertido, los ensayos comportamentales se realizan en un ambiente iluminado con luz roja de baja intensidad.

Protocolo experimental: Se coloca al animal en una de las esquinas de la arena del CA, mirando hacia el ángulo opuesto de las paredes. Toda la maniobra se realiza suavemente para evitar los estímulos estresantes para las ratas. Se contabilizan los cruzamientos con las cuatro patas de un cuadrante a otro, las elevaciones en dos patas y los acicalamientos min a min durante los 5 min que dura la sesión.

## **CULTIVO PRIMARIO DE NEURONAS**

Se aíslan hipocampos o corteza de embriones de ratas Wistar de 17-18 días de gestación (E17-18) siguiendo un protocolo basado en el descrito por Brewer y col. (Brewer, 1995; Brewer y col., 1993), con algunas modificaciones.

Se realiza la eutanasia de las ratas preñadas por decapitación, se extrae el útero con los embriones y se lo transfiere a un tubo estéril. El procedimiento continúa en condiciones de esterilidad en flujo laminar horizontal. Se transfiere el útero con los embriones a una placa con PBS, de cada bolsa embrionaria se recuperan los embriones y se transfieren las cabezas a otra placa con PBS. Se disecciona el cerebro y se transfiere a otra placa con PBS. Bajo lupa, de cada cerebro se separan los hemisferios, se retiran las meninges y se diseccionan los hipocampos que se recolectan en un tubo con PBS. Por otro lado, se diseccionan la corteza y se

recolecta en un tubo separado. Las disecciones se realizan en serie sobre bloques de hielo y con PBS frío. El procedimiento continúa en condiciones de esterilidad en flujo laminar vertical.

Los hipocampos y/o cortezas se lavan dos veces con *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS). El tejido se pasa a un tubo falcon y se descarta el sobrante de HBSS. Se agrega 2 ml de DMEM con 0.25 % tripsina y ADNasa 0.001 % y se incuba a 37 °C por 20 min, agitando periódicamente de manera suave. Se descarta la tripsina, se agrega 5 ml de DMEM con 10 % de suero fetal bovino inactivado (SFBi) y se incuba por 10 min a 37 °C para inactivar el restante de tripsina. Se pasa el tejido a un microtubo, se realizan dos lavados con HBSS, se agrega 1 ml de HBSS y se aíslan las células por disgregación mecánica pasando 10 veces el volumen a través de aguja de 0.6 mm de diámetro y entre 2 y 4 veces por aguja de 0.4 mm de diámetro. Se traspasa la suspensión a un tubo falcon. Se agregan 4 ml de HBSS y se incuba a temperatura ambiente (TA) por 10 min para decantar el tejido no disgregado. El SN se pasa a un nuevo tubo y se centrifuga a 500 g por 1 min a TA. Se descarta el SN y se resuspende el *pellet* en 3 ml de Neurobasal (NB) completo (NB suplementado con 2% B27 (Invitrogen) y 0.5 mM Glutamina).

Se cuentan células en cámara de Neubauer y se calcula la densidad celular. Se estima que por cada embrión se obtienen 10<sup>6</sup> precursores neuronales. En placas previamente polilisinadas se siembran, para ensayos de *Western blot*, 500000 células/pocillo en placas MW6 y, para ensayos de inmunocitoquímica, 120000 células/placa en placas p60 con cubreobjetos circulares de 12 mm de diámetro previamente tratados para aumentar su porosidad (ver abajo). La siembra se realiza en un volumen mínimo de 1,5 ml por pocillo en MW6, 2 ml en placas de 35 mm de diámetro y 0.5 ml en placas MW24.

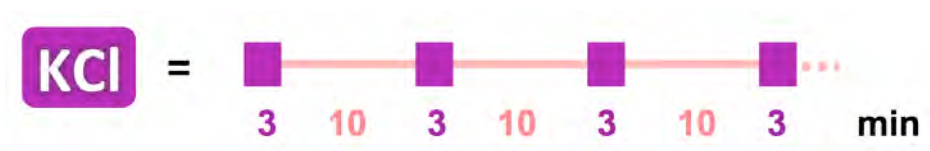
Los cultivos se mantienen en incubador humidificado con atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 %. A partir de los 7 DIVs, se realizan cambios de medio dos veces por semana: se retira 1/3 del volumen que se conserva a 4 °C para su uso posterior (NB reciclado) y se agrega NB completo fresco hasta completar el volumen.

Con el objetivo de aumentar la porosidad de los cubreobjetos para mejorar la adherencia de las células, se tratan los cubreobjetos con acetona en agitación constante por 20 minutos, se lavan con etanol 96°, seguido por etanol 70 % y agua destilada estéril, y finalmente se colocan en las placas. Las placas (con o sin cubreobjetos) se tratan con 1 volumen de poli-L-lisina 0.1 mg/ml (Sigma) por al menos 2 h a 37 °C. Luego se retira la poli-L-lisina y se realizan al menos 3 lavados con abundante agua destilada estéril.

## ESTIMULACIÓN POR PULSOS DE KCl

Los cultivos se estimulan siguiendo el protocolo previamente validado por Wu y col. (2001), con leves modificaciones. En este modelo se ha descrito activación persistente de la vía de las quinasas, dependiente de Ras, PKA y MEK. Estas moléculas juegan un rol importante en la LTP (Brambilla y col., 1997; English y Sweatt, 1997; Huang y col., 1994; Impey y col., 1998). La activación de esta vía en dendritas fue crítica para la formación de nuevos filopodios dendríticos estables por horas (Wu y col., 2001).

Brevemente, se realizan 4 pulsos de estimulación por incubación con una solución KCl 55 mM en NB reciclado, con intervalos de 10 min en NB reciclado. En la **Figura 9** se esquematiza el protocolo de estimulación.



**Figura 9. Esquema del protocolo de estimulación por pulsos de KCl.** Se realizan 4 pulsos de 3 min en KCl 55 mM en NB reciclado (cuadros violetas), con intervalos de 10 min en NB reciclado (líneas rosas).

## INMUNOCITOQUÍMICA

Se transfieren los cubreobjetos con células a una placa con PBS. Se descarta el PBS y se incuba por 15 min en solución fijadora (4% paraformaldehído, 4% sacarosa en PBS). Se realizan 3 lavados de 5 min con PBS y se incuba por 10 min con solución permeabilizadora (0.1 % Tritón X-100 en PBS). En cámara húmeda, sobre una superficie cubierta con Parafilm, por cada cubreobjetos se coloca sobre el Parafil una gota de aproximadamente 40 µl de solución de bloqueo (3% suero normal de cabra en PBS) y sobre ella cuidadosamente se coloca el cubreobjetos con la superficie que tiene las células en contacto con la solución de bloqueo, y se incuba por 1 h. Luego, sobre una nueva superficie cubierta con Parafilm, se coloca una gota de la dilución de anticuerpo primario en solución de bloqueo y sobre la gota se coloca el cubreobjetos con la superficie con células en contacto con el anticuerpo; se incuba por 1 h en cámara húmeda. Se transfieren los cubreobjetos a una placa y se realizan 3 lavados de 10 min



con solución de lavado (0.5% Tween-20 en PBS). En otra superficie recubierta con Parafilm, en cámara húmeda y protegidos de la luz, se incuban por 2 h los cubreobjetos sobre una gota de dilución del anticuerpo secundario en solución de bloqueo. Se transfieren los cubreobjetos a una placa MW24 y se realizan 3 lavados de 10 min con solución de lavado. Se incuba en Hoechst 33258 Stain (H-3569) por 5 min. Se realizan dos lavados con PBS y un último lavado con agua destilada. Se elimina el excedente de agua apoyando cuidadosamente el cubreobjetos contra un papel absorbente y se monta en portaobjetos contra una gota de medio de montaje (Fluoromont, Dako). El procedimiento completo se realiza a temperatura ambiente. Para el almacenamiento por periodos prolongados, se sella el borde del cubreobjetos al portaobjetos con esmalte transparente y se mantiene a 4 °C protegido de la luz. En los ensayos realizados se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios de conejo: anti-GluN1 1:100 (Sigma), anti-GluN2A 1:100 (Millipore) y anti-GluN2B 1:100 (Millipore), y los siguientes anticuerpos secundarios de cabra: Cy2 anti-conejo (1:300, Jackson ImmunoResearch Laboratories) y Alexa Fluor 568 anti-conejo (1:400, Life Technologies).

## **Cuantificación**

Se observan los preparados bajo microscopio de fluorescencia (IX81, Olympus) y se obtienen microfotografías que se cuantifican utilizando el programa ImageJ. Para el análisis de inmunofluorescencia total, se selecciona la zona de interés y se cuantifica la densidad integrada. Para calcular la Inmunofluorescencia Celular Total Corregida (ICTC), para cada campo se realizan varias mediciones de la intensidad promedio del fondo, que luego se promedian (IPF). Para cada célula, se multiplica la superficie de cada célula por la IPF del campo correspondiente, y se resta ese valor de la densidad integrada. Para cuantificar puntos (*puncta*) en las dendritas, se mide la longitud de la prolongación y se cuentan manualmente los puntos ubicados sobre ese trazado. En todos los casos los datos se analizan estadísticamente utilizando el programa GraphPad Prism (GraphPad, CA).

## **WESTERN BLOT**

### **Disección de estructuras cerebrales**

Los animales se eutanasian por decapitación. Se abre el cráneo y se extrae el cerebro, que se lava en *buffer* de disección (sacarosa 0.32 M en PB 0.1 M) frío. Se realiza la disección de

las estructuras cerebrales sobre una superficie fría y se recolectan en tubos individuales. Las muestras se conservan a -80 °C.

### **Preparación de muestras**

Las muestras obtenidas por disección se homogeneizan en frío en *buffer* de lisis (20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 0.2 % Triton, pH 7.4) al que se le agregan, al momento de su uso, un cóctel de inhibidores de proteasas (concentración final Aprotinina 1 µM, Leupeptina 1 µM, Pepstatina 1 µM, EDTA 100 µM, con DMSO como conservante) y EGTA 1 mM. Las muestras se incuban por 30 min en hielo agitando periódicamente. Luego se centrifugan por 10 min a 12000 rpm a 4 °C y se recupera el SN en un nuevo tubo. Las muestras homogenizadas se conservan a -80 °C.

Para muestras de cultivos celulares, se realiza un lavado con PBS, se agrega un volumen mínimo de PBS y se recolectan las células por raspado con un rastrillo, se recolectan en un tubo y se centrifugan por 5 min a 1500 rpm. Se descarta el SN y se resuspende el pellet en en *buffer* de lisis. Las muestras se incuban por 30 min en hielo agitando periódicamente y luego se conservan a -80 °C.

Previamente al ensayo de *Western blot* se desnaturalizan las muestras por agregado de *buffer* Laemmli (2 % SDS, 5% β-mercaptoetanol, 10 % glicerol, 0.002 % azul de bromofenol, 0.125 mM Tris-HCl) e incubación a 100 °C por 5 min. Una vez desnaturalizadas, las muestras pueden conservarse a -20 °C.

### **Electroforesis en gel de poliacrilamida**

Las muestras desnaturalizadas se someten a electroforesis unidireccional en gel de poliacrilamida conteniendo SDS (SDS-PAGE). Las proteínas se resuelven utilizando un gel concentrador al 4% (acrilamida:bisacrilamida (30:1) 4 %, Tris-HCl 0.125 M pH 6.8, SDS 0.1 %, persulfato de amonio 0.05 %, TEMED 0.1 %) y un gel separador al 7.5 % (acrilamida:bisacrilamida (30:1) 7.5 %, Tris-HCl 0.375 M, pH 8.8, SDS 0.1 %, persulfato de amonio 0.05 %, TEMED 0.05 %). La electroforesis se realiza utilizando un aparato *Mini Protean 2 Cell* (Bio-Rad) y *buffer* de corrida (Tris base 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0.1%, pH 8.3). Se corre a un voltaje constante de 80 V hasta que las muestras ingresan al gel concentrador, y luego se corre a 120 V hasta que el frente de corrida llega al borde del gel. Las proteínas se

transfieren desde el gel a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF, Bio-Rad) de 0.2  $\mu$ m de malla, previamente sumergidas durante 30 seg en metanol. La transferencia se realiza utilizando el aparato *Bio-Rad Mini-Transblot Module* (Bio-Rad) y *buffer* de transferencia (Tris base 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0.1 %, pH 8.8). La transferencia se realiza a 350 mA (amperaje constante) por 70 min en heladera o en una bachea con hielo. Las membranas se bloquean por 2 h por incubación con *buffer* de bloqueo (20 mM Tris, 500 mM NaCl, Tween-20 0.1 %, pH 7.4 en TTBS) con 5% de leche descremada. Se realizan 3 lavados con TTBS y luego se cortan las membranas tomando como referencia el tamaño de los marcadores de peso molecular, de modo de obtener una parte superior donde se encuentran las subunidades del RNMDA, y otra inferior donde migran los controles de carga (actina o GAPDH). Las mitades superiores se incuban con anticuerpo primario anti-GluN1 1:1000 (Sigma), anti-GluN2A 1:1000 (Millipore), anti-GluN2B 1:500 (Millipore o BD Biosciences según corresponda) o anti-His-tag 1:4000 diluidos en TTBS 3% BSA. Las mitades inferiores se incuban con anticuerpos primarios anti-actina 1:6000 (Sigma) o anti-GAPDH 1:20000 (Sigma) diluidos en TTBS 3% BSA. La incubación se realiza en agitación suave ON a 4 °C. Se realizan 3 lavados de 10 min con TTBS y, posteriormente, se incuban las membranas con los anticuerpos secundarios correspondientes (anti-ratón o anti-conejo) conjugados con peroxidasa de rábano (HRP) diluidos en TTBS, por 2 h en agitación suave a TA. Se realizan 3 lavados de 10 min con TTBS y luego se incuba con sustrato quimioluminiscente (ECL Plus Reagent, Amersham) según las indicaciones del fabricante. Se realiza la exposición de placas radiográficas (Agfa) que luego se revelan manualmente utilizando reveladores y fijadores de uso odontológico (Romek).

### **Semi-cuantificación**

Una vez reveladas, las placas radiográficas se digitalizan. Cada banda se cuantifica por densitometría computarizada utilizando el programa ImageJ (NIH). Se normaliza el valor de cada banda de interés al valor de la banda del control de carga correspondiente. Para permitir la comparación entre muestras de distintos geles, el valor normalizado de cada muestra se normaliza al promedio de muestras de un grupo presente en los geles a comparar.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos paramétricos, provenientes de variables cuantitativas que se distribuyen normalmente, se expresan como medias  $\pm$  el desvío estándar de la media (SEM). La comparación entre dos grupos se realiza mediante la prueba t de Student para muestras apareadas o no apareadas, según corresponda. Las comparaciones entre más de dos grupos se realizan por Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía, seguido por la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett (media de cada grupo vs. media de un grupo control) o seguido por la prueba de comparaciones múltiples de Newman-Keuls (media de cada grupo vs. media de cada uno de los otros grupos).

Los datos no paramétricos, provenientes de variables cuantitativas que no siguen una distribución normal, se expresan como mediana con sus intervalos intercuartiles. Para la comparación entre dos grupos apareados se emplea la prueba de Wilcoxon, y para la comparación de dos grupos no apareados se utiliza la prueba de Mann-Whitney. El análisis de más de dos grupos independientes se realiza por ANOVA de Kruskal-Wallis, seguido por prueba de comparaciones múltiples de Dunn. Para el análisis de más de dos grupos apareados se utiliza la prueba de Friedman, seguida por prueba de comparaciones múltiples de Dunn.

El análisis se realiza utilizando el programa GraphPad Prism. Se considera que las diferencias son estadísticamente significativas cuando la probabilidad  $p < 0.05$ .

# RESULTADOS

---



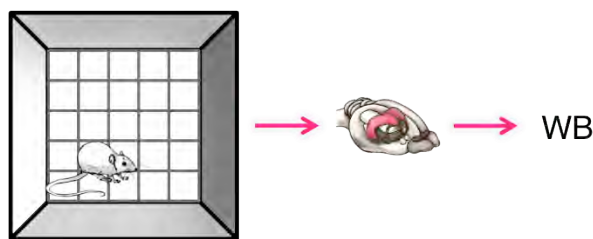
## SUBUNIDADES DEL RNMDA Y MEMORIA EN RATAS DE GENOTIPO SALVAJE Y TG MODELO DE LA EA

La expresión de las subunidades del RNMDA varía durante el desarrollo y su expresión en las sinapsis se modifica rápidamente luego de la inducción de plasticidad en rodajas de hipocampo (ver Introducción, sección Receptores NMDA, página 5; y sección RNMDA y memoria, página 10). Sin embargo, hay poca información acerca de la expresión de las subunidades del RNMDA luego de la inducción de plasticidad sináptica o la adquisición de una memoria, particularmente en ratas adultas. En relación con la EA, los RNMDA forman parte del complejo que une los o $\beta$ A a las sinapsis, y median parte de los efectos deletéreos desencadenados por esta unión (Ver Introducción, sección RNMDA y Enfermedad de Alzheimer, página 12). Con el fin de estudiar la relación LTP-aprendizaje, en nuestro laboratorio llevamos a cabo registros electrofisiológicos en rodajas de hipocampo de rata adulta, induciendo LTP y luego analizando los niveles de las subunidades del RNMDA en esas rodajas de hipocampo; en ellos observamos un aumento de las subunidades GluN1 y GluN2A 70 min después de la inducción de LTP (Baez y col., 2013 ).

En base a estos antecedentes, nos preguntamos si el aumento de las subunidades GluN1 y GluN2A se observaría *in vivo* luego de una experiencia comportamental, dónde podría estar localizado dicho cambio, y si estos fenómenos se observarían a distintas edades en condiciones normales y patológicas, relacionadas con la EA.

El diseño experimental se esquematiza en la **Figura 10**. Estudiamos el comportamiento de distintos grupos de animales en el paradigma del CA, evaluando la MT y la formación de MLP (ver Materiales y Métodos, sección Campo abierto, página 27). Los animales fueron eutanasiados a distintos tiempos luego de la tarea y sus hipocampos fueron disecados como se indica en Materiales y Métodos (sección Disección de estructuras cerebrales, página 31). Analizamos entonces los niveles de las subunidades del RNMDA mediante *Western blot* en esos homogenatos de hipocampo (ver Materiales y Métodos, sección *Western blot*, página 31). Estudiamos animales de genotipo salvaje (Controles) y animales Tg modelo de la EA, adultos jóvenes y de 1 año de edad.

Como modelo de la EA utilizamos ratas Tg McGill-R-Thy1-APP (Leon y col., 2010). Estas ratas presentan una patología progresiva, que se desarrolla de manera similar a la observada en pacientes con EA. En animales adultos jóvenes se observa la presencia de o $\beta$ A



**Figura 10. Esquema general del diseño experimental.** Los animales fueron expuestos al CA y eutanasiados luego de la tarea. Una vez separados los hipocampos, se realizaron los homogenatos y se analizaron por *Western blot* (WB).

intracelulares, sin presencia de placas extracelulares evidentes, conjuntamente con un déficit cognitivo en el laberinto acuático de Morris (LAM) en su versión espacial (tarea dependiente de hipocampo y de corteza cerebral) para los animales homocigotas. Estas características se asemejan a las de un estadio temprano de la EA. Estos animales presentan placas seniles extracelulares a partir de los 6 meses, evidenciando a los 13 meses un deterioro cognitivo en el LAM que correlaciona positivamente con los niveles de  $\alpha\beta$ A corticales. En animales hemicigotas no se ha observado desarrollo de patología extracelular (fueron estudiados hasta los 20 meses), y su desempeño comportamental resulta intermedio entre el grupo Control y el grupo hemicigota (Leon y col., 2010).

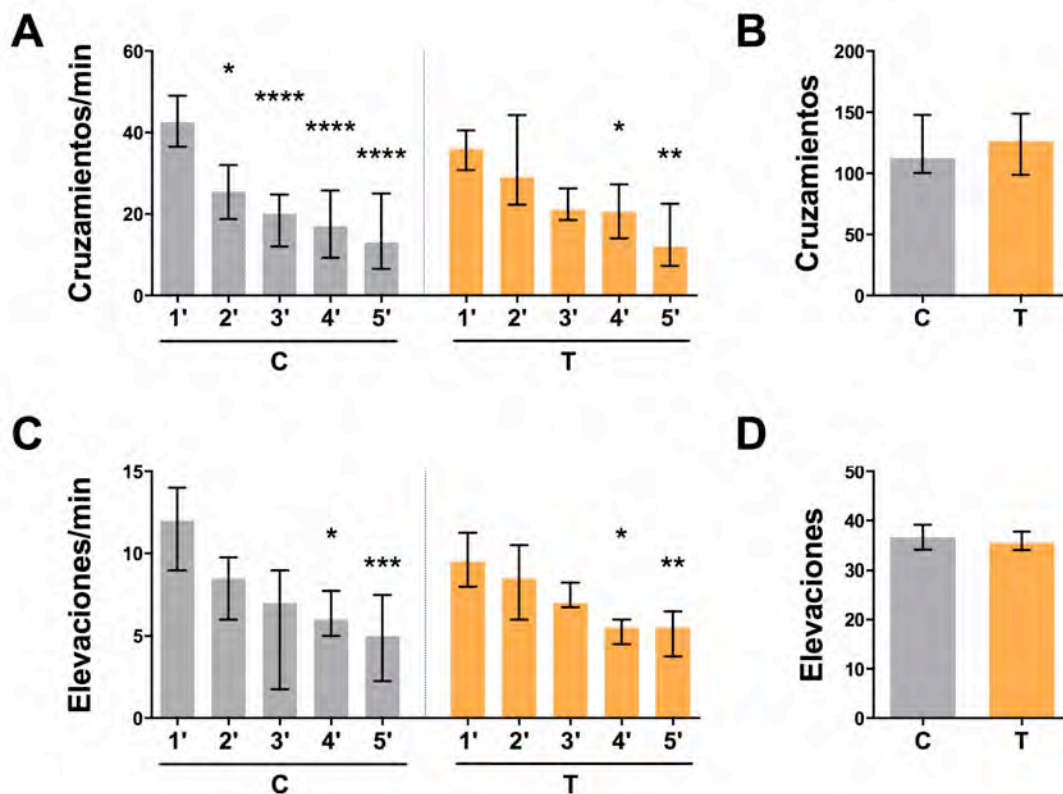
## ANIMALES ADULTOS JÓVENES

### Memoria de trabajo

Entrenamos animales adultos jóvenes, Controles y Tg, en una sesión de CA de 5 min, cuantificando min a min los parámetros exploratorios número de cruzamientos y de elevaciones en las patas posteriores para evaluar la MT. Se ha demostrado que una sesión de 5 min de CA induce habituación dependiente de hipocampo, la que persiste como memoria de corto plazo (MCP) y como MLP (Izquierdo y col., 1992; Vianna y col., 2000). Por otro lado, entrenamos animales Controles en una sesión de CA de 1 min de duración, ya que se ha demostrado que la exposición por 1 min en el CA no es suficiente para inducir habituación (Izquierdo y col., 1992; Vianna y col., 2000).

La **Figura 11** muestra el desempeño de animales Controles y Tg adultos jóvenes en una sesión de 5 min de CA.





**Figura 11. Desempeño de animales adultos jóvenes en una sesión de CA.** Diagramas de barras de las medianas con rangos intercuartiles (0,25; 0,75) del número de cruzamientos (**A**) y el número de elevaciones (**C**) durante cada uno de los 5 min en el CA; así como del total de cruzamientos (**B**) y elevaciones (**D**) en los 5 min de sesión, para animales Controles (C, barras grises) y Tg (T, barras naranjas). Comparación del primer min de la sesión vs. los siguientes min (2, 3, 4 y 5) para cruzamientos/min y elevaciones/min dentro de un mismo grupo, por prueba de Friedman para medidas repetidas, seguida por prueba de comparaciones múltiples de Dunn. Comparación entre grupos Control y Tg para los cruzamientos/min y elevaciones/min del primer min de la sesión, y para el total de cruzamientos y de elevaciones en los 5 min de sesión, por prueba de Mann-Whitney.\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ . C, N=16; T, N=6.

Para los animales Controles hubo disminución significativa del número de cruzamientos/min en los min 2, 3, 4 y 5 con respecto al primer min de la sesión, y para los Tg hubo disminución significativa en los min 4 y 5 con respecto al primer min de la sesión (**Figura 11, A**). No encontramos diferencias significativas entre los grupos Control y Tg para los cruzamientos/min correspondientes al primer min de la sesión, ni para los correspondientes al quinto min de la sesión.

Tanto para animales Controles como para Tg, hubo disminución significativa de las elevaciones/min en el cuarto y quinto min comparado con el primer min de la sesión (**Figura 11, C**). No encontramos diferencias significativas entre los grupos Control y Tg para las elevaciones/min correspondientes al primer min de la sesión.

No observamos diferencias significativas entre el grupo Control y el grupo Tg para los cruzamientos y las elevaciones totales en los 5 min de sesión (**Figura 11, B y D**).

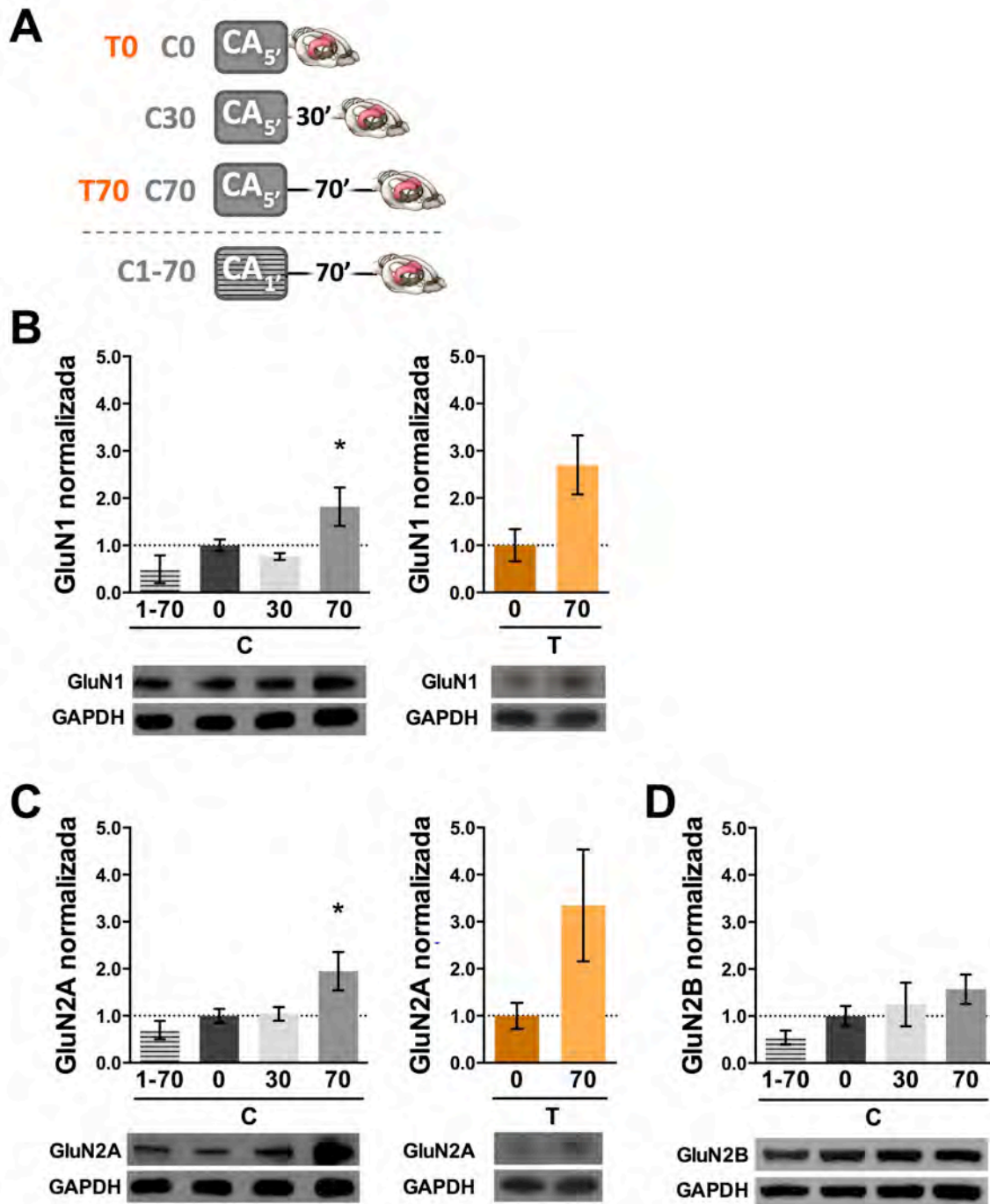
Corroboramos de esta manera que las ratas adultas jóvenes, tanto Controles como Tg, reconocieron el ambiente novedoso y se habituaron evidenciando MT.

### **Niveles de subunidades del RNMDA en hipocampo luego de una sesión de CA**

Una vez finalizada la sesión de CA, los animales fueron eutanasiados a distintos tiempos conformando los siguientes grupos: animales Control y Tg eutanasiados inmediatamente luego de la sesión de CA (grupos C0 y T0), y aquellos eutanasiados 30 y 70 min luego de la tarea (grupos C30, C70 y T70; respectivamente). Las ratas del grupo Control que exploraron el CA durante 1 min, fueron eutanasiadas 70 min luego de la exposición al CA (grupo C1-70). Se disecaron los hipocampos y se realizaron homogenatos individuales, los cuales fueron analizados mediante Westernblot para determinar los niveles de las subunidades GluN1, GluN2A y GluN2B (**Figura 12**).

Para el grupo Control se evidenció un aumento de aproximadamente 2 veces en las subunidades GluN1 y GluN2A, 70 min luego de la sesión de 5 min de CA (grupo C70 vs. grupo C0) (**Figura 12, B y C**), también se evidenciaron diferencias significativas entre el grupo C70 y los grupos C1-70 y C30. No se detectaron variaciones significativas en los niveles de la subunidad GluN2B entre los grupos estudiados (**Figura 12, D**). No encontramos diferencias significativas entre los grupos C0 y C1-70 para ninguna de las subunidades analizadas (**Figura 12, B y C**), sugiriendo que el aumento en las subunidades GluN1 y GluN2A del hipocampo a los 70 min de una exposición por 5 min al CA (grupo C70), no estaría relacionado con la simple exposición al ambiente novedoso.

Para las subunidades GluN1 y GluN2A correspondientes a animales Tg entrenados en una sesión de CA de 5 min de duración, las diferencias no fueron significativas entre el grupo eutanasiado 70 min luego de la sesión (T70), con respecto al grupo eutanasiado inmediatamente luego de la sesión (T0) (**Figura 12, B y C**).



**Figura 12. Niveles de subunidades del RNMDA en hipocampo de ratas adultas jóvenes luego de una sesión de CA.** Ratas Control (C, barras grises) y Tg (T, barras naranjas) fueron entrenadas en 1 sesión de CA y fueron eutanasiadas a distintos tiempos luego de la sesión. Se realizaron homogenatos de hipocampo individuales y se determinaron por *Western blot* los niveles de las subunidades GluN1, GluN2A y GluN2B. Grupos 0, 30 y 70: ratas entrenadas en una sesión de 5 min y eutanasiadas inmediatamente, 30 min o 70 min luego de la sesión, respectivamente. Grupo C1-70: ratas entrenadas en 1 sesión de CA de 1 min y eutanasiadas 70 min luego de la sesión. **A.** Esquema del diseño experimental. **B, C y D.** Niveles de las subunidades del RNMDA en homogenatos de hipocampo. Diagramas de barras de las medias  $\pm$  SEM para los niveles normalizados de las subunidades GluN1 (**B**) y GluN2A (**C**), graficando a la izquierda los valores para los grupos de animales Controles y a la derecha los valores para los grupos Tg; y la subunidad GluN2B (**D**) para los grupos de animales Controles. \* $p < 0.05$ , por ANOVA de una vía, seguido por comparación múltiple de Newman-Keuls para la comparación entre

grupos Controles, y por t test para muestras no apareadas para la comparación de grupos Tg. **Insertos inferiores:** bandas de *Western blot* representativas para cada subunidad y para el control de carga GAPDH. Para GluN1, grupos C1-70, C0, C30, C70, T0 y T70, N= 3, 4, 4, 3, 3 y 3, respectivamente. Para GluN2A, grupos C1-70, C0, C30, C70, T0 y T70, N=4, 4, 4, 4, 3 y 3, respectivamente. Para GluN2B, grupos C1-70, C0, C30 y C70, N= 3, 4, 4, 4, respectivamente.

A pesar del bajo número de muestras (con notable dispersión) en los grupos Tg, tanto para la subunidad GluN1 como para la subunidad GluN2A se puede observar una franca tendencia de aumento a los 70 min del CA, en el mismo sentido del aumento observado para los animales Controles\* .

En la **Tabla 1** se muestra la relación entre los niveles protéicos de cada subunidad observados en hipocampo a los 70 min e inmediatamente luego de una sesión de CA (relación 70/0) en animales Controles y Tg adultos jóvenes.

### Relación 70/0

	Adultos jóvenes	
	C	T
<b>GluN1</b>	2.66	2.70
<b>GluN2A</b>	2.70	3.35

**Tabla 1. Relación de los niveles de las subunidades GluN1 y GluN2A a distintos tiempos luego de la habituación a un CA.** Para los grupos Control (C) y Tg (T) adultos jóvenes se calculó la relación entre los niveles de cada subunidad (GluN1 y GluN2A) 70 min luego de la sesión de CA y los niveles observados inmediatamente luego de la sesión (relación 70/0).

Para las dos subunidades analizadas, se pudo observar que para animales adultos jóvenes, tanto Controles como Tg, una relación 70/0 similar y mayor a 1. Es decir, que los valores a 70 min son más altos que inmediatamente después del CA, tanto para Controles como para Tg. Aunque los resultados detallados en la sección anterior no evidenciaron diferencias significativas en los valores de las subunidades 70 min luego de una sesión de CA para los animales Tg adultos jóvenes, el análisis de la relación 70/0 sugeriría que el aumento podría existir.

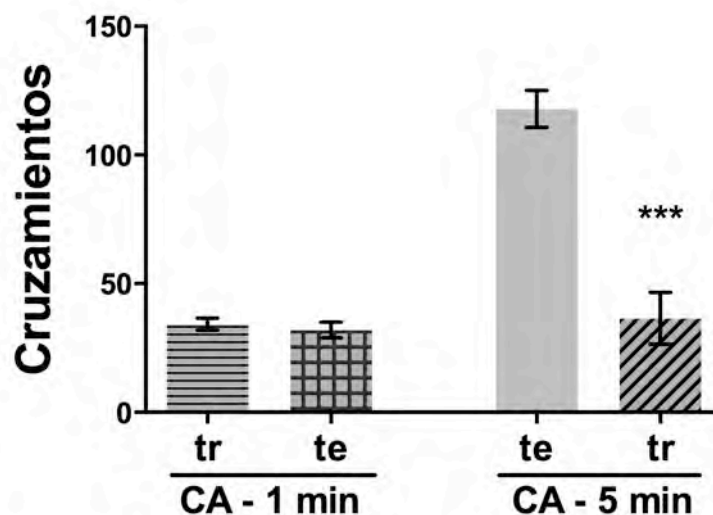
*\* Este resultado es preliminar para los animales Tg, ya que sólo contamos con 3 animales por cada grupo.*

Nuestros resultados demuestran que hay MT en animales Tg adultos jóvenes, y lo corroboran para animales Controles de la misma edad. Por otro lado, demuestran que 70 min luego de la habituación, los niveles de las subunidades GluN1 y GluN2A aumentan significativamente en hipocampo de animales Controles. Y, aunque para el grupo Tg los cambios no resultaron significativos, se observó una marcada tendencia al aumento en el mismo sentido que en los animales del grupo Control.

### Capacidad de formación de MLP

Para evaluar la formación de MLP de habituación a un ambiente novedoso, entrenamos animales Controles adultos jóvenes en dos sesiones de CA, separadas por 24 h, cuantificando el número de cruzamientos en cada sesión. Un grupo fue entrenado en dos sesiones de 5 min y otro fue entrenado en dos sesiones de 1 min.

En la **Figura 13** se muestra el desempeño de animales Controles adultos jóvenes en las dos sesiones de CA, de 1 min o 5 min de duración.



**Figura 13. Desempeño de animales Controles adultos jóvenes en dos sesiones de CA.** Diagramas de barras de medias  $\pm$  SEM para los cruzamientos en las sesiones de entrenamiento (tr) y prueba (te) para animales Controles entrenados en dos sesiones de CA de 1 min de duración (CA - 1 min) o de 5 min de duración (CA - 5 min). \*\*\* $p < 0,001$  por t test para muestras apareadas. N=8 para ambos grupos.

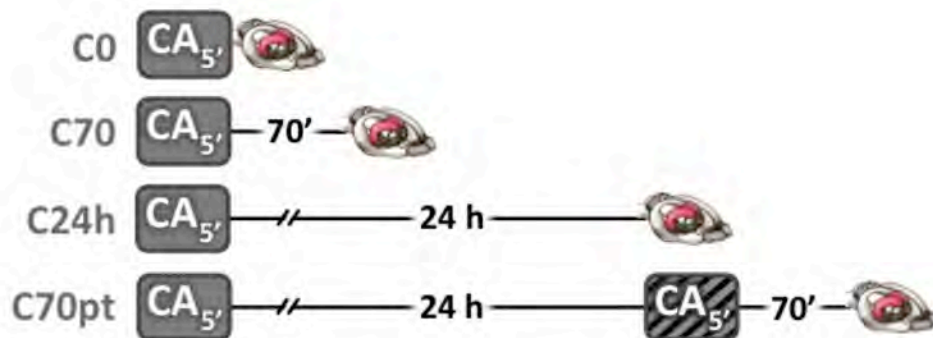
Observamos una disminución significativa de los cruzamientos en la segunda sesión con respecto a la primera, para el grupo de animales que exploraron el CA en sesiones de 5 min, mientras que no observamos diferencias significativas entre sesiones para los animales

expuestos al CA por 1 min. De esta manera, corroboramos la formación de MLP de habituación en animales adultos jóvenes expuestos a dos sesiones de 5 min de duración, mientras que no observamos formación de MLP en animales expuestos a sesiones de 1 min.

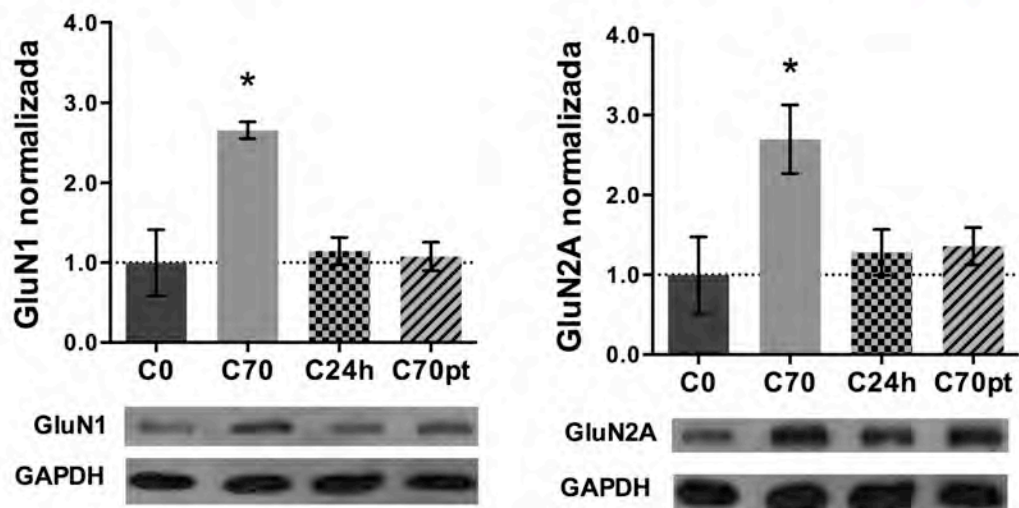
### Niveles de subunidades del RNMDA en hipocampo luego de dos sesiones de CA

Para tratar de discriminar si la habituación a un ambiente novedoso, la exploración o la locomoción podrían ser responsables por los cambios en las subunidades GluN1 y GluN2A observados en el grupo C70, analizamos estas subunidades en el hipocampo de ratas Controles expuestas a dos sesiones de 5 min separadas por 24 h, que fueron eutanasiadas 70 min luego de la segunda sesión (grupo C70pt). Para evaluar si los cambios observados previamente en el grupo C70 persistían en el tiempo, algunos animales fueron entrenados en una única sesión de 5 min y eutanasiados 24 h después (grupo C24h). Estos resultados fueron comparados con aquellos obtenidos para los Controles expuestos a una sesión de CA de 5 min y eutanasiados inmediatamente (grupo C0) o 70 min después de la tarea (grupo C70).

**A**



**B**



**Figura 14. Niveles de GluN1 y GluN2A en hipocampo de animales Controles adultos jóvenes expuestos a una o dos sesiones de CA.** (A) Esquema del diseño experimental. (B) Diagrama de barras de las medias  $\pm$  SEM de los niveles de las subunidades GluN1 y GluN2A analizados por *Western blot* en hipocampos de ratas eutanasiadas inmediatamente, 70 min o 24 h luego de una sesión de CA (grupos C0, C70 y C24h, respectivamente) y ratas eutanasiadas 70 min luego de dos sesiones de CA separadas por 24 h (grupo C70pt). \* $p < 0.05$ , por ANOVA de una vía, seguido por prueba de comparaciones múltiples de Dunnett. **Inserto inferior:** bandas de *Western blot* representativas para cada subunidad y para el control de carga GAPDH.

En la **Figura 14** se esquematiza el diseño experimental y se muestran los niveles de subunidades del RNMDA en hipocampos de animales eutanasiados a distintos tiempos luego de una o de dos sesiones de CA, analizados mediante *Western blot*.

Como se muestra en la **Figura 14**, 24 h luego de una única sesión de CA (grupo C24h) los niveles de las subunidades GluN1 y GluN2A en hipocampo, resultaron similares a los niveles obtenidos inmediatamente luego de una única sesión (grupo C0). Con respecto a los animales que exploraron el CA en dos sesiones de 5 min separadas por 24 h, que fueron eutanasiados inmediatamente o a los 70 min (grupos C0pt y C70pt, respectivamente), los niveles de GluN1 y GluN2A luego de la segunda sesión de CA fueron similares a aquellos observados inmediatamente y 24 h luego de una única sesión de CA (grupos C0 y C24h, respectivamente).

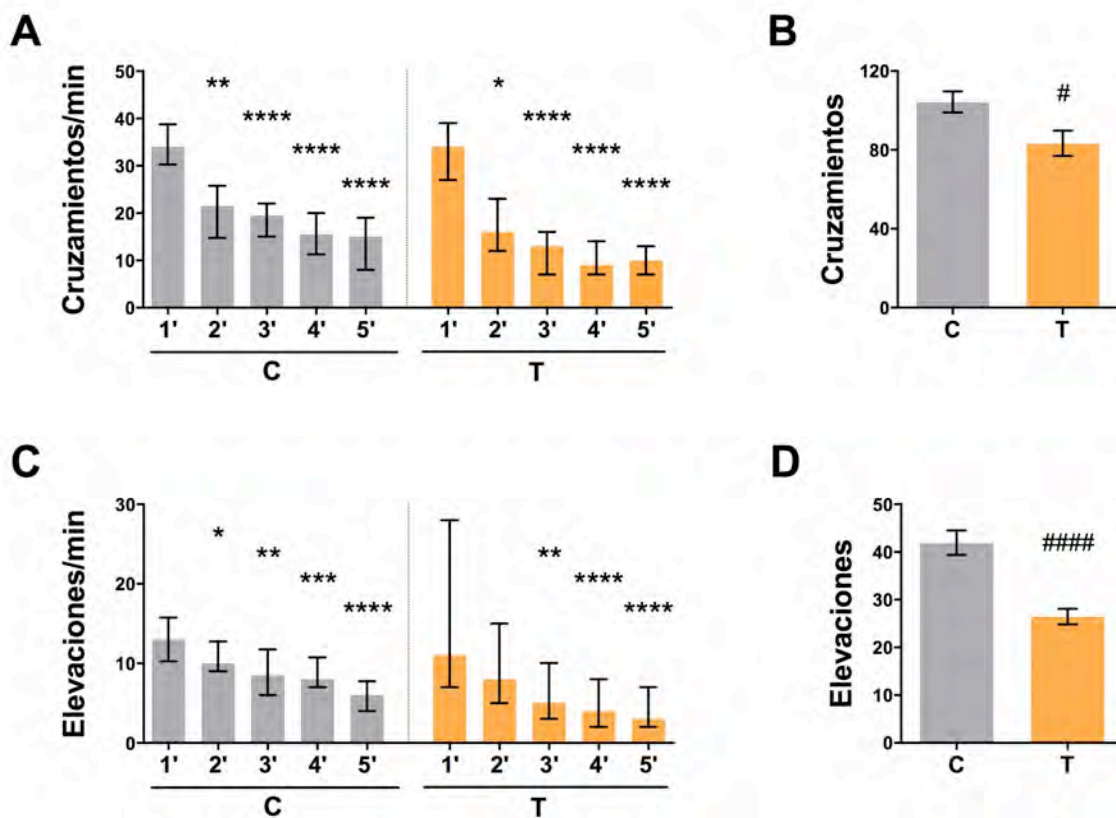
Estos resultados demuestran que los aumentos observados 70 min luego de 1 sesión de CA fueron transitorios. El hecho de que los niveles de las subunidades, en las ratas que exploraron dos veces el CA por 5 min, fueran similares a los niveles observados inmediatamente luego del CA, sugiere fuertemente que el aumento observado no estaría relacionado con la mera exposición al CA o con su exploración, sino que podría tener relación con la memoria formada.

## ANIMALES DE 1 AÑO

En base a los resultados obtenidos en animales jóvenes, nos preguntamos si animales de 1 año de edad serían capaces de formar memorias de habituación y, si luego de la habituación, observaríamos modificaciones en los niveles de las subunidades GluN1 y GluN2A de sus hipocampos, tal como observamos en animales adultos jóvenes. Para responder estas preguntas, expusimos animales de 1 año de edad, Controles y Tg, a una o a dos sesiones de CA, obteniendo sus hipocampos a distintos tiempos luego de la tarea para analizar en ellos los niveles de las subunidades GluN1 y GluN2A mediante *Western blot* (ver Materiales y Métodos, secciones Discción de estructuras cerebrales y *Western blot*, página 31).

## Memoria de trabajo

Para evaluar la MT en la habituación a un ambiente novedoso en animales de 1 año de edad, entrenamos ratas Controles y ratas Tg en una sesión de 5 min en el CA, evaluando min a min el número de cruzamientos y de elevaciones. Medimos también el total de acicalamientos y deposiciones en la sesión, parámetros que permiten una evaluación cualitativa del nivel de estrés producido por el ambiente novedoso (ver Materiales y Métodos, sección Campo abierto, página 27).



**Figura 15. Desempeño de ratas de 1 año de edad expuestas a una sesión de CA.** Ratas Controles (C, barras grises) y ratas Tg (T, barras naranjas) fueron expuestas a una sesión de 5 min en el CA. Se midieron los cruzamientos y las elevaciones durante cada uno de los 5 min de la sesión, y el total de cruzamientos y de elevaciones durante los 5 min de la sesión CA. **A, C.** Diagramas de barras de medianas con rangos intercuartiles (0,25; 0,75) del número de cruzamientos (**A**) y elevaciones (**C**) durante cada uno de los 5 min en el CA. **B, D.** Diagramas de barras de medias  $\pm$  SEM del total de cruzamientos (**B**) y de elevaciones (**D**) durante los 5 min del CA. (\*) Comparación de los min 2, 3, 4 y 5 vs. el primer min de la sesión por prueba de Friedman, seguida por prueba de comparaciones múltiples de Dunn. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ . (#) Comparación entre grupos Control y Tg para los cruzamientos/min y las elevaciones/min, por prueba de mann-Whitney. (##) Comparación entre grupos Control y Tg para los cruzamientos/min y las elevaciones/min del primer min de la sesión, por prueba de Mann-Whitney, y para el total de cruzamientos y de elevaciones en los 5 min de sesión, por t test para muestras no apareadas.; #  $p < 0.05$ , ###  $p < 0.001$ . C, N=20; T, N=15.



Como se observa en la **Figura 15**, tanto para los Controles como para los Tg, hubo disminución significativa del número de cruzamientos/min en los min 2, 3, 4, y 5, con respecto al primer min de la sesión. Para los Controles observamos una disminución significativa del número de elevaciones/min en los min 2, 3, 4, y 5 con respecto al primer min de la sesión, y para los Tg, en los min 3, 4 y 5 con respecto al primer min de la sesión (**Figura 15, A y C**). Estos resultados evidencian que hubo MT para la habituación al nuevo ambiente, tanto en Controles como en Tg de 1 año de edad.

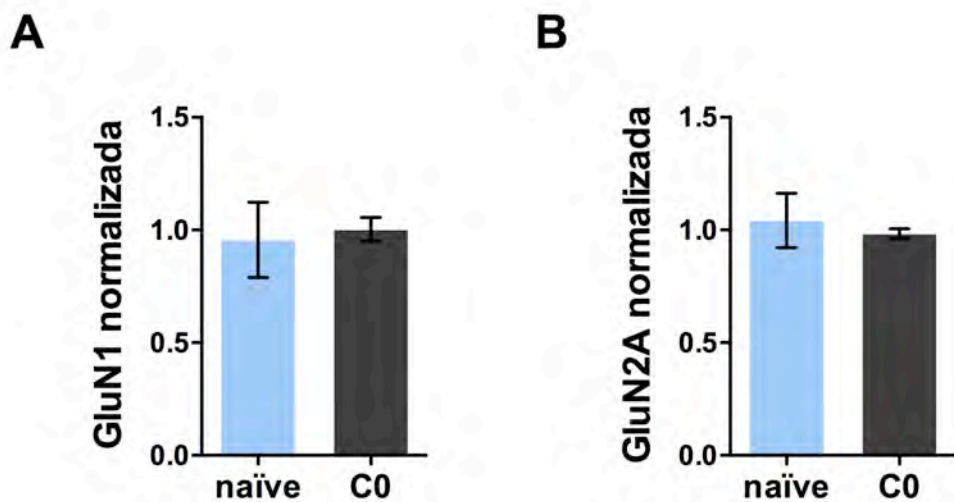
No se detectaron diferencias significativas entre los grupos Control y Tg cuando se compararon los cruzamientos/min y elevaciones/min del primer min de la sesión vs. el último min (C-1' vs. T-1') (**Figura 15, A y C**). Hubo diferencia entre grupos Control y Tg en total de cruzamientos y el total de elevaciones en los 5 min de sesión, resultando los totales para el grupo Tg significativamente menores que para el grupo Control (**Figura 15, B y D**). Por otro lado, no se observaron diferencias significativas entre los grupos Control y Tg para el total de acicalamientos y de deposiciones en los 5 min de sesión (resultados no mostrados).

Estos resultados muestran que hubo MT tanto en Controles como en Tg, y que ambos genotipos presentaron niveles aparentes de estrés (símil-ansiedad) semejantes ante la exposición al ambiente novedoso. Sin embargo, se evidenció un comportamiento exploratorio significativamente menor en los animales Tg, sin que esto perjudicara la MT.

### **Niveles de subunidades del RNMDA en hipocampo luego de una sesión de CA**

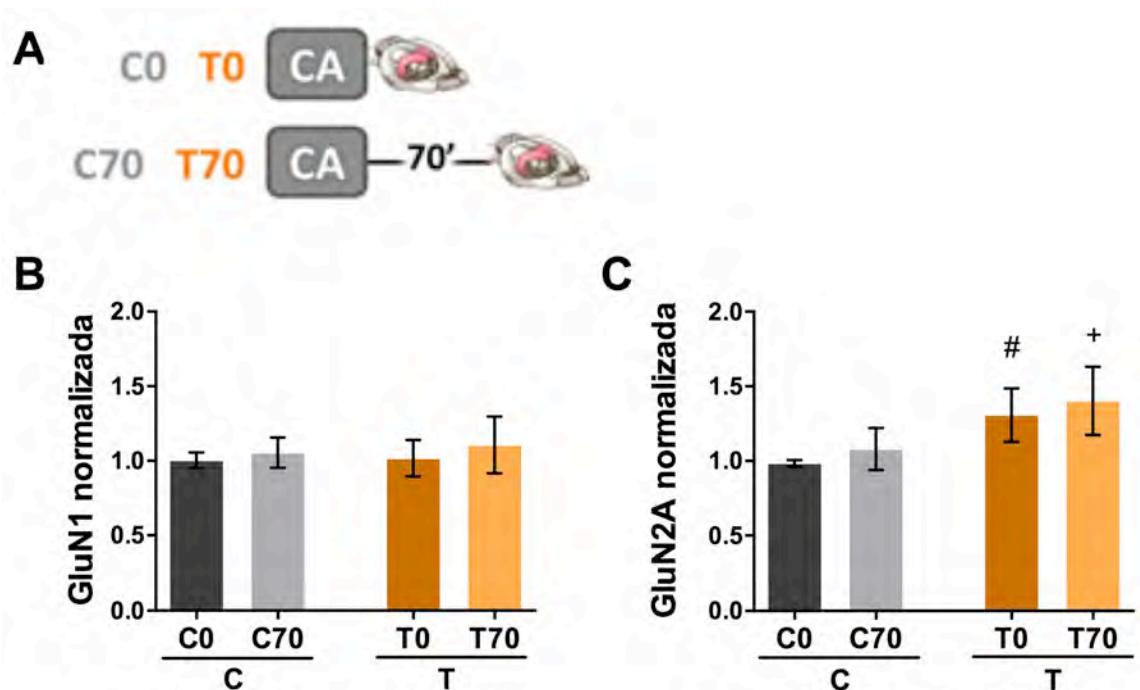
Una vez finalizada la exposición al CA, los animales fueron eutanasiados a distintos tiempos: inmediatamente (C0, T0) o 70 min (C70, T70) luego del CA. Analizamos mediante *Western blot* los niveles de subunidades GluN1 y GluN2A en homogenatos de hipocampo (ver Materiales y Métodos I, secciones Disección de estructuras cerebrales y *Western blot*, página 31). Incluimos en el análisis animales de 1 año de edad que no fueron expuestos al CA (grupo naïve), para establecer el nivel basal de las subunidades a esta edad y compararlas con el grupo C0, considerado el grupo de referencia para las comparaciones en los niveles de las subunidades.

Como se muestra en la **Figura 16**, para Controles de 1 año de edad no hubo diferencias significativas en los niveles de subunidades GluN1 y GluN2A, entre el grupo naïve y el grupo eutanasiado inmediatamente luego de una sesión de CA.



**Figura 16. Niveles de GluN1 y GluN2A en hipocampo de ratas de 1 año.** Diagramas de barras de medias  $\pm$  SEM de los niveles de subunidades GluN1 (**A**) y GluN2A (**B**) normalizados. Un grupo de animales Controles fue eutanasiado inmediatamente luego de la sesión de CA (C0, barras negras) y otro fue eutanasiado sin ser expuesto a ninguna tarea (naïve, barras celestes). Se determinaron los niveles de las subunidades GluN1 (**A**) y GluN2A (**B**) en hipocampo por *Western blot*. Los valores de densidad óptica se normalizaron al control de carga GAPDH y al promedio del grupo C0. Comparación entre grupos C0 y naïve para cada subunidad por t test para muestras no apareadas. Naïve, N=4; C0, N=10.

La **Figura 17** muestra los niveles de subunidades de los grupos Control y Tg para distintos tiempos luego de la exposición a un CA.



**Figura 17. Niveles de GluN1 y GluN2A en hipocampo de ratas de 1 año luego de una única sesión de CA.** **A.** Esquema del diseño experimental. **B, C.** Diagramas de barras de medias  $\pm$  SEM de los niveles de GluN1 (**B**) y GluN2A (**C**) normalizados, en animales Controles (C, barras grises y negras) y Tg

(C, barras naranjas). Los animales fueron eutanasiados inmediatamente (grupos C0 y T0, barras oscuras) o 70 min (grupos C70 y T70, barras claras) luego de la sesión de CA. Mediante la técnica de *Western blot* se determinaron los niveles de las subunidades GluN1 (**B**) y GluN2A (**C**). Los valores de densidad óptica se normalizaron al control de carga GAPDH y al promedio del grupo C0. Comparaciones por t test para muestras no apareadas (\*) dentro de un mismo genotipo (Tg o Control) entre grupos eutanasiados inmediatamente o 70 min luego de la sesión, (#) entre grupos Control y Tg eutanasiados al mismo tiempo post-CA (C0 vs. T0, C70 vs. T70) y (+) entre grupos Control y Tg eutanasiados a diferentes tiempos (C0 vs. T70, C70 vs. T0). \*, #  $p < 0.05$ . C0, C70, T0 y T70, N=10, 10, 6 y 4, respectivamente.

En animales Controles no hubo cambios significativos en los niveles de las subunidades GluN1 y GluN2A en hipocampo a los 70 min de la exposición al CA (**Figura 17**), a diferencia de los observado en jóvenes.

En el grupo Tg no hubo cambios significativos en los niveles de GluN1 y GluN2A entre el grupo eutanasiado inmediatamente post-CA y el grupo eutanasiado 70 min después.

No hubo diferencias significativas en los niveles de la subunidad GluN1 entre los grupos Control y Tg eutanasiados a un mismo tiempo ni a diferentes tiempos luego de la tarea (**Figura 17, B**).

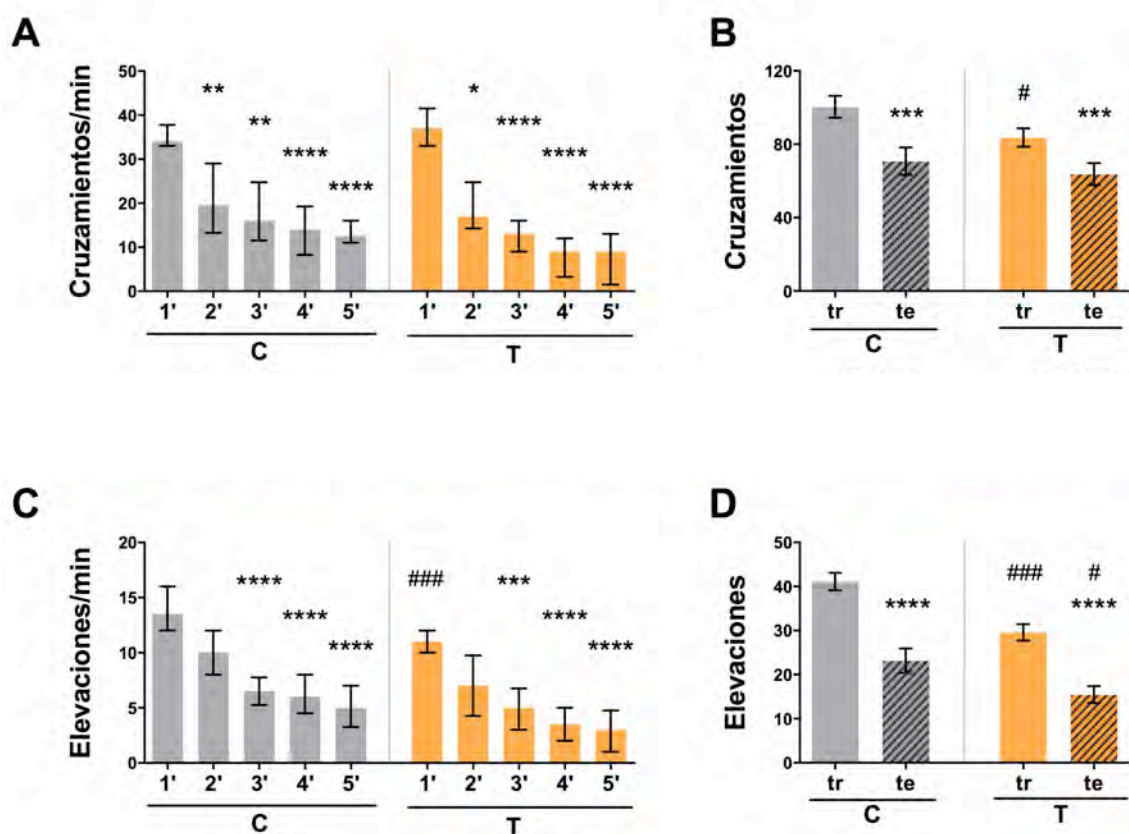
Hubo diferencias significativas entre Controles y Tg en los niveles de la subunidad GluN2A. Tanto el grupo T0 como el grupo T70 presentaron niveles significativamente mayores que el grupo C0. (**Figura 17, C**).

## Capacidad de formación de MLP

Evaluamos la formación de MLP de habituación a un ambiente novedoso en animales Controles y Tg de 1 año de edad. Expusimos a los animales a dos sesiones de CA de 5 min de duración, separadas por 24 h, midiendo la exploración (contabilizando cruzamientos y elevaciones) y la respuesta de estrés (contabilizando acicalamientos y deposiciones). Durante la primera sesión registramos el número de cruzamientos y elevaciones min a min, de manera de evaluar también la MT en estos animales.

La **Figura 18** muestra el desempeño de animales Controles y Tg de 1 año en dos sesiones de CA separadas por 24 h.

En la primera sesión de CA los animales de 1 año, tanto Controles como Tg, mostraron disminución significativa del número de cruzamientos en los min 2, 3, 4 y 5 con respecto al primer min de la sesión (**Figura 18.A**). Las elevaciones/min fueron significativamente menores



**Figura 18. Desempeño de animales de 1 año de edad durante dos sesiones de CA separadas por 24 h.** Número de cruzamientos/min (**A**), cruzamientos (**B**), elevaciones/min (**C**) y elevaciones (**D**) en la sesión de entrenamiento (tr, barras lisas) y en la sesión de prueba (te, barras rayadas) para ratas Controles (C, barras grises) y ratas Tg (T, barras naranjas) expuestas a dos sesiones de CA de 5 min separadas por 24 h. **A, C.** Diagramas de barras de medianas con rangos intercuartiles (0,25; 0,75) del número de cruzamientos/min (**A**) y de elevaciones/min (**C**) durante cada uno de los 5 min en la primera sesión de CA. (\*) Comparación de los cruzamientos/min (**A**) y de las elevaciones/min (**C**) entre los min 2, 3, 4 y 5 vs. el primer min de la sesión, por prueba de Friedman, seguida por prueba de comparaciones múltiples de Dunn. (#) Comparación entre los grupos Contol y Tg para los cruzamientos/min (**A**) y las elevaciones/min (**C**) durante el primer min (C-1' vs. T-1') por prueba de Mann-Whitney. \*  $p < 0.05$ ; **B, D.** Diagramas de barras de medias  $\pm$  SEM para los cruzamientos (**A**) y las elevaciones (**B**) durante la primera sesión (tr, barras lisas) y la segunda sesión (te, barras rayadas) de CA. (\*) Comparación de los cruzamientos (**B**) y las elevaciones (**D**) entre la primera y la segunda sesión de CA para un mismo grupo (Control o Tg) por prueba de Wilcoxon. (#) Comparación entre grupos Control y Tg para los cruzamientos (**B**) y las elevaciones (**D**) en la sesión de entrenamiento y en la sesión de prueba (C-tr vs. T-tr y C-te vs. T-te) por prueba de Mann-Whitney. \*, #  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*, ###  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ . C, N=16; T, N=20.

en los min 3, 4, y 5 con respecto al primer min de la sesión para ambos grupos (**Figura 18.C**). De esta manera, tanto los animales Controles como Tg de 1 año evidenciaron MT relacionada con el reconocimiento del nuevo ambiente, como habíamos observado previamente.

Tanto para Controles como para Tg, hubo disminución significativa de los cruzamientos (**Figura 18.B**) y de las elevaciones (**Figura 18.D**) en la segunda sesión (test) con respecto a la primera sesión (entrenamiento), evidenciando formación de MLP de la habituación al CA.

A diferencia de los resultados obtenidos en el primer grupo de animales de 1 año, en este caso hubo diferencia significativa entre los grupos Control y Tg al comparar las elevaciones/min realizadas durante el primer min de la sesión (C-1' vs. T-1'). Al comparar el total de cruzamientos y el total de elevaciones, se evidenciaron parametros significativamente menores en el grupo Tg. Estos resultados indican que la actividad exploratoria fue menor en este grupo de animales Tg y sugieren la existencia de una diferencia en la conducta exploratoria entre animales Controles y Tg.

No hubo cambios significativos ni en los acicalamientos ni en las deposiciones entre las sesiones de entrenamiento y de test, ni para el grupo Control ni para el grupo Tg. Tampoco se observaron diferencias significativas entre los grupos Control y Tg en los acicalamientos ni en las deposiciones, en ninguna de las sesiones, lo que sugiere que el nivel de estrés fue similar en ambas sesiones y para ambos grupos.

### **Niveles de subunidades del RNMDA en hipocampo luego de dos sesiones de CA**

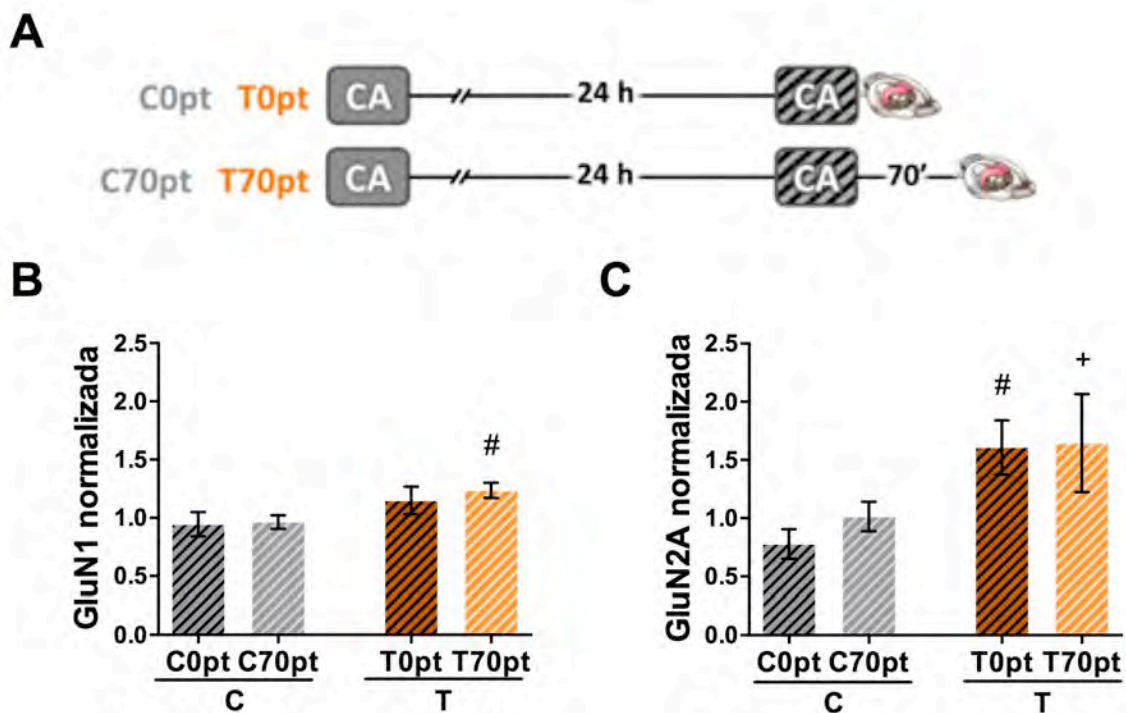
Una vez finalizada la segunda sesión de CA, eutanasiarnos los animales a distintos tiempos y analizamos, como en los casos anteriores, los niveles de las subunidades GluN1 y GluN2A en homogenatos de hipocampo mediante *Western blot*.

En la **Figura 19** se muestran los niveles de subunidades GluN1 y GluN2A en hipocampo de ratas Controles y Tg a distintos tiempos luego de dos sesiones de CA.

Como se observa en la **Figura 19**, no hubo diferencia en los niveles de las subunidades GluN1 ni GluN2A cuando se compararon animales de un mismo genotipo eutanasiados a distintos tiempos.

Se evidenciaron niveles significativamente mayores para la subunidad GluN2A en animales Tg con respecto a los Controles, así como se había observado en Tg de 1 año luego de una sesión de CA.

En resumen, los animales de 1 año, Controles y Tg, evidenciaron MT y formación de MLP de habituación al ambiente. Sin embargo, a diferencia de lo observado en animales



**Figura 19. Niveles de GluN1 y GluN2A en hipocampo de animales de 1 año luego de dos sesiones de CA.** **A.** Esquema del diseño experimental. **B, C.** Diagramas de barras de las medias  $\pm$  SEM. Los animales Controles (C) y Tg (T) fueron eutanasiados inmediatamente (grupos C0pt y T0pt, barras oscuras) o 70 min (grupos C70pt y T70pt, barras claras) luego de la segunda sesión de CA. Mediante la técnica de *Western blot* se determinaron los niveles de las subunidades GluN1 (**B**) y GluN2A (**C**). Los valores se normalizaron al control de carga GAPDH y al promedio del grupo C0. Comparaciones por t test para muestras no apareadas (\*) dentro de un mismo genotipo (Tg o Control) entre grupos eutanasiados inmediatamente o 70 min luego de la sesión, (#) entre grupos Control y Tg eutanasiados al mismo tiempo post-CA (C0 vs. T0, C70 vs. T70) y (+) entre grupos Control y Tg eutanasiados a diferentes tiempos post-CA (C0 vs. T70, C70 vs. T0). C0pt, C70pt, T0pt, T70pt, N=5, 4, 5 y 5, respectivamente.

jóvenes, no se observó modificación de las subunidades GluN1 ni GluN2A a los 70 min de una sesión de CA. Llamativamente, todos los grupos Tg mostraron niveles de GluN2A significativamente mayores a los de los Controles.

## SUBUNIDADES DEL RNMDA EN UN MODELO *IN VITRO* LUEGO DE UNA ESTIMULACIÓN REPETIDA

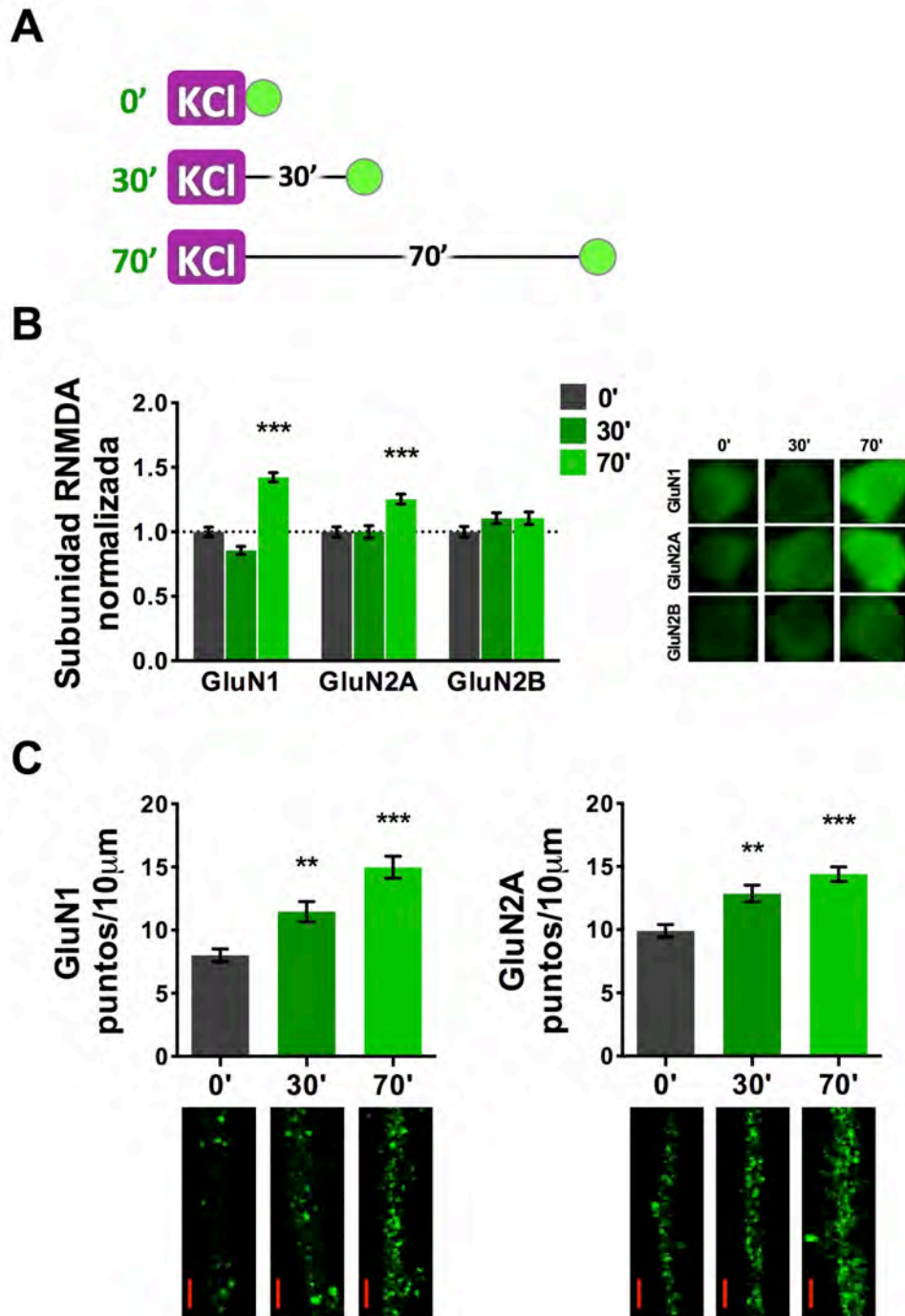
Los experimentos *in vivo* presentados en esta Tesis demuestran que en animales adultos jóvenes hay aumento de las subunidades GluN1 y GluN2A 70 min luego de la habituación a un ambiente novedoso. Como se mencionó previamente, en nuestro laboratorio hemos estudiado la relación LTP-aprendizaje en un modelo *ex vivo*, demostrando que 70 min luego de la inducción de LTP en rodajas de hipocampo de ratas adultas jóvenes hay aumento de las subunidades GluN1 y GluN2A (Baez y col., 2013).

Como siguiente objetivo nos propusimos estudiar la localización celular de los cambios observados a los 70 min de la habituación en animales jóvenes y de la inducción de LTP en rodajas de hipocampo. Para ello, continuamos el trabajo en un modelo *in vitro*, exponiendo cultivos primarios de neuronas de hipocampo a estímulos despolarizantes (pulsos de KCl) repetidos, según el protocolo reportado por Wu y col. (Wu y col., 2001). Este protocolo produjo activación persistente de la vía de las MAP quinasas (MAPK) en dendritas, y dicha activación resultó crítica para la protusión de nuevos filopodios dendríticos estables por horas. El establecimiento de la señalización dendrítica persistente a través de las MAPK resultó ser dependiente de PKA, y su mantenimiento requirió la activación continua de MEK. Estos autores demostraron que Ras, PKA, MEK y MAPK estaban involucradas en la actividad persistente de las quinasas. Como es sabido, dichas moléculas juegan un rol importante en la LTP (Brambilla y col., 1997; English y Sweatt, 1997; Huang y col., 1994; Impey y col., 1998). Además, reportes previos han demostrado que la formación de memoria depende de estimulación repetida a través de entrenamiento espaciado, MAPK, PKA y cambios estructurales en las dendritas (Atkins y col., 1998; Bailey y col., 1997; Kogan y col., 1997; Schafe y col., 1999; Yin y col., 1994). En base a estos antecedentes, Wu y col. establecieron que el protocolo de despolarización repetida produce en las dendritas cambios símil-LTP (Wu y col., 2001).

Tomando como referencia los tiempos analizados previamente, fijamos los cultivos inmediatamente, a 30 o 70 min luego de la estimulación, y analizamos en ellos la expresión de las subunidades del RNMDA por inmunofluorescencia utilizando anticuerpos específicos contra las subunidades GluN1, GluN2A y GluN2B, como se detalla en Materiales y Métodos (sección Inmunocitoquímica, página 30). Se tomaron microfotografías con un microscopio de epifluorescencia y se analizó la fluorescencia de los cuerpos neuronales y se cuantificaron los puntos “dendríticos” utilizando el programa ImageJ.

La **Figura 20** muestra el análisis de los niveles de las subunidades del RNMDA en el cuerpo y en las prolongaciones neuronales en cultivos fijados a distintos tiempos luego de la estimulación.

Como se muestra en la **Figura 20, B**, la inmunofluorescencia en los cuerpos neuronales aumentó significativamente para GluN1 ( $1.42 \pm 0.06$  veces) y GluN2A ( $1.26 \pm 0.04$  veces), 70 min luego de la estimulación, comparada con los cultivos control. No se observaron cambios significativos en la inmunofluorescencia total de los somas para ninguna de las subunidades a



**Figura 20. Subunidades del RNMDA en cultivos maduros de neuronas de hipocampo luego de una estimulación símil-LTP.** Cultivos maduros de neuronas de hipocampo fueron estimulados con pulsos de KCl. A distintos tiempos luego de la estimulación (inmediatamente, 30 o 70 min post-estimulación) se fijaron las células y se realizó un ensayo de inmunofluorescencia contra las subunidades GluN1 o GluN2A. **A.** Esquema del diseño experimental. **B.** Cuantificación de la inmunofluorescencia total en el cuerpo neuronal. Comparación por ANOVA de una vía, seguido por prueba de comparaciones múltiples de Dunnett. Se cuantificaron aproximadamente 100 cuerpos neuronales para cada grupo. \*\*\*  $p < 0.001$ . **Inserto a la derecha:** cuerpos neuronales representativos de cada condición. **C.** Cuantificación de la inmunofluorescencia de GluN1 y GluN2A en dendritas. Se cuantificaron ( $N=100$  neuritas por grupo). Comparación por prueba de Kruskal-Wallis seguida por prueba de comparaciones múltiples de Dunn. \*\*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . **Inserto inferior:** dendritas representativas de cada condición. Barra de escala: 2 µm.



los 30 min de la estimulación. No se observaron cambios significativos para ninguno de los tiempos analizados en la inmunofluorescencia total de los cuerpos neuronales para GluN2B.

Observamos aumentos significativos de las subunidades GluN1 y GluN2A en las neuritas 30 y 70 min luego de la estimulación, comparado contra cultivos fijados inmediatamente luego de la estimulación (grupo 0) (**Figura 20**). La densidad de puntos correspondientes a la inmunofluorescencia para GluN1 aumentó 1.5 y 2 veces a 30 y 70 min respectivamente ( $8 \pm 1$  puntos/10  $\mu$  de neurita en cultivos control,  $12 \pm 1$  puntos/10  $\mu$  de neurita en los cultivos a 30 min y  $15 \pm 2$  puntos/10  $\mu$  de neurita en los cultivos a 70 min). También observamos aumento de los puntos correspondientes a la inmunofluorescencia para GluN2A en las neuritas ( $13 \pm 1$  y  $14 \pm 1$  puntos/10  $\mu$  de neurita luego de 30 y 70 min respectivamente, comparado con  $10 \pm 1$  puntos/10  $\mu$  en neuritas inmediatamente luego de la estimulación) (**Figura 20, C**).

En un modelo donde se han reportado cambios símil-LTP, estos resultados evidenciaron un cambio “plástico” más en las neuronas luego de la estimulación: aumento de GluN1 y GluN2A 70 min luego de la estimulación, en concordancia con resultados obtenidos en ensayos *in vivo* y *ex vivo*. En este modelo hemos observado que el aumento de las subunidades GluN1 y GluN2A se daría inicialmente (a los 30 min) por una relocalización de las subunidades existentes en el *pool* subsináptico (Barria y Malinow, 2002; Bellone y Nicoll, 2007; Yin y col., 2012), ya que cambia la distribución de la fluorescencia pero se modifica la inmunofluorescencia total. A los 70 min de la estimulación el cambio se observa tanto en las dendritas como en la inmunofluorescencia total. Este cambio podría requerir síntesis protéica. El aumento en los puntos dendríticos sugiere fuertemente el ensamblado y la expresión de nuevos RNMDA-GluN2A a los 30 y 70 min. De acuerdo con estos resultados, Grosshans y col. (2002) reportaron una disminución intracelular y un aumento en la superficie celular de GluN1 y GluN2A (Grosshans y col., 2002). En cultivos maduros de neuronas (22-30 DIVs), la actividad de los RNMDA reprime la traducción de GluN2B, mientras que el bloqueo prolongado de los RNMDA libera dicha represión (Chen y Bear, 2007). Así, nuestros resultados concuerdan con el hecho de que la actividad neuronal facilita la expresión de GluN2A y reprime la traducción de GluN2B en neuronas maduras, llevando esto a un aumento de la relación GluN2A/GluN2B en respuesta a la actividad neuronal.



## DISCUSIÓN

---



## RNMDA Y MEMORIA

Los receptores RNMDA están involucrados en plasticidad sináptica y en el procesamiento de memorias. A partir de la hipótesis "RNMDA-LTP" propuesta por Morris (Morris, 1986), la relación entre los RNMDA y la memoria ha sido intensamente estudiada; la mayoría de los antecedentes se han basado en el bloqueo o la modificación de la subunidad GluN1, presente en todos los RNMDA. El rol de los diferentes subtipos de RNMDA en la formación de memorias ha sido menos estudiado, y los resultados han sido controversiales.

En ratones Tg sobre-expresando GluN2A en telencéfalo, el comportamiento básico y la MCP no se vieron afectados; sin embargo, se observaron déficits en la formación de MLP en varios paradigmas comportamentales. En la región CA1 de estos ratones Tg, no se afectó la inducción de LTD por estimulación de 1 Hz ni la LTP inducida por estimulación de 100 Hz, pero sí se vió impedida la LTD en respuesta a una estimulación en el rango de los 3-5 Hz (Cui y col., 2013). Dalton y col. (2012) demostraron que el bloqueo de los RNMDA-GluN2A por el antagonista NVP, perjudicó tanto la LTP en rodajas de amígdala, como la adquisición de una memoria de condicionamiento del miedo. Sin embargo, NVP no afectó la LTD ni la extinción de la memoria de condicionamiento del miedo. Por otro lado, demostraron que el bloqueo de los RNMDA-GluN2B por el antagonista Ro25-6981 impidió la LTD en rodajas de amígdala y el aprendizaje de extinción de la memoria condicionada del miedo, mientras que no tuvo efecto en la inducción de LTP ni en la adquisición de esa memoria. Estos resultados, aunque controversiales en algunos casos, muestran que hay un rol diferencial de los RNMDA-GluN2A y RNMDA-GluN2B en plasticidad y memoria (Dalton y col., 2012). También se reportó una mejora en el aprendizaje en ratones sobre-expresando GluN2B (Wang y col., 2009); pero las conclusiones con respecto al rol de los RNMDA-GluN2B fueron objetadas, ya que hubo una sobre-expresión general del RNMDA.

En nuestro laboratorio se ha comprobado que antagonistas relativamente selectivos para GluN2B facilitaron la consolidación de memorias luego de entrenamientos sub-umbrales (Cercato y col., 2014; Cheli, 2006), sugiriendo que los RNMDA-GluN2B tendrían un efecto inhibitorio en la consolidación temprana (Cercato y col., 2014; Cheli, 2006).

## RNMDA Y MEMORIA EN RATAS DE GENOTIPO SALVAJE

En animales adultos jóvenes de genotipo salvaje pudimos verificar la habituación a un ambiente novedoso, corroborando que hubo MT y formación de MLP cuando los animales fueron expuestos a un CA por 5 min. A los 70 min de la exposición a una sesión de CA de 5 min, se verificó en hipocampo un incremento en los niveles de las subunidades GluN1 y GluN2A, sin cambios en GluN2B. A las 24 h de la exposición al CA, GluN1 y GluN2A se encontraron en niveles similares a los observados inmediatamente después de la sesión, indicando que el aumento fue transitorio. Los niveles de GluN1 y GluN2A 70 min después de dos sesiones de CA separadas por 24 h, no fueron estadísticamente diferentes de los niveles observados inmediatamente después de una única sesión. Los animales expuestos a sesiones de 1 min no evidenciaron formación de MLP, datos que corroboran resultados previos que demuestran que una sesión de 5 min en un CA induce habituación dependiente de hipocampo, que persiste como MCP y como MLP, mientras que una sesión de 1 min no es suficiente para inducir habituación (Izquierdo y col., 1992; Vianna y col., 2000).

En conjunto, los resultados hasta aquí nos llevaron a especular inicialmente que el aumento observado podía estar relacionado con la habituación, más que con la mera exposición al ambiente o la locomoción (Baez y col., 2013). Sin embargo, como se discutirá luego, los resultados obtenidos en animales de 1 año no avalaron esta interpretación.

Los RNMDA-GluN2A y RNMDA-GluN2B se caracterizan por una fuerte dependencia del voltaje, alta conductancia al  $\text{Ca}^{2+}$  y lento decaimiento. Los RNMDA-GluN2B presentan mayor afinidad por la CaMKII, apertura más prolongada del canal y mayor capacidad de carga que los RNMDA-GluN2A (Strack y Colbran, 1998; ver Yashiro y Philpot, 2008). Al aumentar GluN2A sin variar GluN2B, la relación GluN2A/GluN2B es mayor, lo cual podría tener relevancia para la plasticidad sináptica, resultando posiblemente en una acción protectora de las sinapsis que han sufrido un cambio plástico reciente, evitando así una nueva modificación plástica luego de un aprendizaje (Baez y col., 2013; Cercato y col., 2014).

Por otro lado, en nuestro laboratorio hemos demostrado que la exposición previa a un CA (con habituación), antes de un entrenamiento supra-umbral en EI, previno la amnesia en esta tarea, producida por bloqueo de los receptores muscarínicos (Colettis y col., 2014) o de los RNMDA del hipocampo dorsal (Cercato y col., 2014) en ratas adultas jóvenes. En función de esos resultados, hemos sugerido que la previa exposición al CA podía promover la codificación de la traza de memoria: así, el aumento de las subunidades GluN1 y GluN2A luego de la

habituaación podría ser parte de un mecanismo de metaplasticidad, al menos en animales adultos jóvenes.

Los animales de genotipo salvaje de 1 año evidenciaron MT y formación de MLP de habituaación cuando fueron expuestos al CA por 5 min. Sin embargo, los niveles de GluN1 y GluN2A en hipocampo, a los 70 min de una sesión de CA, no fueron estadísticamente diferentes de los niveles observados inmediatamente después de la sesión; es decir que no se detectó aumento 70 min luego de la habituaación al CA, a diferencia de lo observado en adultos jóvenes.

Estos resultados sugieren que el mecanismo por el cual se produce el aumento de GluN1 y GluN2A luego de habituaación al CA, podría verse afectado por el envejecimiento y, además, que el aumento de GluN1 y GluN2A no estaría directamente relacionado con la habituaación.

Dependiendo de la edad y del estado de los animales, se reportaron cambios dinámicos en las subunidades GluN2A y GluN2B, que afectan la composición de los subtipos de RNMDA en el telencéfalo (Rauner y Köhr, 2011; Tsien, 2000). GluN2B predomina en estadios post-natales y juveniles, y GluN2A se vuelve prominente en adultos y en edades avanzadas (Cao y col., 2007; Clayton y col., 2002; Hestrin, 1992; Monyer y col., 1994, 1992; Sheng y col., 1994; Tang y col., 2001). Algunos autores reportaron que la subunidad GluN2A sería la menos susceptible a los efectos del envejecimiento, en comparación con GluN1 y GluN2B (ver Magnusson y col., 2010). Por ejemplo, Liu y col. (2008) evidenciaron disminución de GluN1 en hipocampo de ratas Sprague-Dawley envejecidas (24 meses), sin modificación de GluN2A, cuando evaluaron los niveles proteicos por *Western blot* (Liu y col., 2008). Se ha hipotetizado que el aumento de la relación GluN2A/GluN2B en cerebros adultos y añosos, podría constituir un factor genético subyacente al deterioro gradual de la memoria en cerebros envejecidos, con respecto a cerebros jóvenes (Cao y col., 2007; Clayton y col., 2002; Tang y col., 1999; Tsien, 2000; Zhao y col., 2009). Varios antecedentes indican que la relación GluN2A/GluN2B aumentaría con la edad y que los RNMDA-GluN2B disminuirían en la sinapsis. Entonces, posiblemente la regulación de la expresión del receptor y de la subunidad GluN2A en particular, se modificarían con la edad.

Los incrementos transitorios en GluN1 y GluN2A, observados en animales jóvenes, podrían estar relacionados con el establecimiento/persistencia de la plasticidad sináptica, contribuyendo a la transición de LTP temprana a LTP tardía, en algún momento luego de la

inducción, aunque nuestros resultados sugieren que el cambio no sería requerido para establecer la MLP. González-Ramírez y col. (2014) demostraron que el envejecimiento atenuó pero no impidió el aprendizaje de una memoria espacial evaluada en el LAM y, basándose en el análisis morfológico de las espinas dendríticas de CA1 de hipocampo de estos animales, sugirieron que las diferencias en el aprendizaje podrían estar asociadas con cambios plásticos en el tipo de espinas dendríticas de las neuronas de CA1 (González-Ramírez y col., 2014). Hemos comprobado que en animales de 1 año hubo habituación con formación de MLP, pero no se produjo el aumento de GluN1 y GluN2A que ocurre en animales jóvenes; lo que muestra que, a edades avanzadas, el comportamiento del sistema luego de aprendizaje sería diferente.

Un incremento en la relación GluN2A/GluN2B podría ser una consecuencia adaptativa compensatoria/homeostática, una vez que la sinapsis sufre algún cambio plástico -como la potenciación-, disminuyendo la probabilidad de plasticidad sináptica posterior y, tal vez, protegiendo el cambio plástico ocurrido, dadas las características de los RNMDA-GluN2A. Estos mecanismos podrían estar alterados en edades avanzadas, tal vez por una regulación diferente o una desregulación de la expresión del RNMDA y de GluN2A en particular.

## **RNMDA Y MEMORIA EN RATAS TG MODELO DE LA EA**

Las ratas McGill-R-Thy1-APP que expresan APP humana con las mutaciones *Swedish* e *Indiana*, propias de esos casos de EA familiar, presentan una patología progresiva con acumulación de  $\beta$ A inicialmente intraneuronal (hasta los 3 meses), que con la edad se acumula también extracelularmente en animales homocigotas (Leon y col., 2010). Antecedentes previos en este modelo Tg evidenciaron deterioro en la memoria de referencia espacial evaluada en el LAM, desde los 3 meses de edad en ratas Tg homocigotas, haciéndose más pronunciado a los 13 meses. Las ratas Tg hemicigotas presentaron un fenotipo intermedio, mostrando diferencias significativas con respecto a los Controles en la curva de aprendizaje evaluada a los 13 meses (pero no a los 3 meses). Sin embargo, no se evidenciaron diferencias significativas entre Tg hemicigotas y Controles en la sesión de prueba, ni a los 3 ni a los 13 meses (Leon y col., 2010). Iulita y col. (2014) evaluaron el desempeño de ratas Tg y Controles en un diseño experimental que incluía un primer día de habituación al ambiente, 24 h después, un entrenamiento en el condicionamiento auditivo del miedo (CAM), luego, evaluación del condicionamiento contextual del miedo (CCM) en la misma arena del entrenamiento del CAM, 24 h después del entrenamiento en el CAM, y aún 24 h más tarde, evaluación de la MLP para el CAM en una nueva arena. En animales de 3 meses (estadio pre-placa) estos autores reportaron



una respuesta (PC, porcentaje de congelamiento) significativamente menor en Tg comparados con Controles, tanto en la respuesta post-choque durante el entrenamiento, como en la evaluación de la MLP en la prueba del CAM realizada 48 h después, evidenciando diferencias en esta memoria dependiente de amígdala; no se evidenciaron diferencias entre los grupos Control y Tg en la sesión de prueba del CCM. En animales de 13 meses (cuando los homocigotas presentan patología extracelular, no así los hemicigotas), se evidenciaron marcadas diferencias entre Controles y Tg en el CAM, presentando homocigotas y hemicigotas PC significativamente menores que los Controles, con diferencias más marcadas en los homocigotas. En la prueba del CAM, realizada en una nueva arena 24 h después del test del CCM, los homocigotas presentaron PC significativamente menores con respecto a los Controles, y no se evidenciaron diferencias en el desempeño entre hemicigotas y Controles. En el CCM, los grupos Tg presentaron PC significativamente menores con respecto a los Controles, con una disminución mayor en homocigotas. En la tarea de reconocimiento de objetos novedosos (RON), aunque los Tg los reconocieron, lo hicieron con diferencias significativas con respecto a los Controles, tanto a los 3 como a los 13 meses, y tanto los homocigotas como los hemicigotas. En la tarea de Localización de Objetos (LO), a los 3 meses los hemicigotas mostraron diferencias significativas con los Controles pero, llamativamente, los homocigotas no fueron estadísticamente diferentes de los Controles. A los 13 meses, tanto hemicigotas como homocigotas mostraron diferencias significativas con los Controles en la tarea de LO (Iulita y col., 2014). Sin embargo, resultados preliminares de nuestro laboratorio sugieren que el desempeño de animales Tg de 1 año en la tarea de LO no sería diferente al desempeño de los Controles (resultados no mostrados).

En ratas Tg adultas jóvenes expuestas al CA por 5 min hubo MT, sin diferencias significativas entre los grupos Control y Tg (ni en el número de cruzamientos ni de elevaciones realizados en el primer min de la sesión, ni en el total de cruzamientos o de elevaciones durante los 5 min de sesión), indicando que los animales Controles y Tg adultos jóvenes se habituaron al ambiente novedoso de manera similar<sup>1</sup>

<sup>1</sup> En un futuro se realizarán más ensayos para verificar la capacidad de formación de MLP en animales Tg adultos jóvenes, experimentos que no fueron realizados durante el desarrollo de esta Tesis por falta de sujetos experimentales.

Las ratas Tg de 1 año evidenciaron MT cuando fueron expuestos al CA por 5 min, y formación de MLP de la habituación en la segunda sesión de CA, 24 h después. Para los animales de 1 año, se evidenciaron diferencias en el desempeño entre Tg y Controles, resultando significativamente menores los parámetros exploratorios (total de cruzamientos y elevaciones) en el grupo Tg. El número de acicalamientos y de deposiciones no fueron diferentes entre Controles y Tg de 1 año, sugiriendo que ambos grupos presentaron niveles aparentes de estrés comportamental semejantes ante la exposición al ambiente novedoso. Estos resultados sugieren que las diferencias entre Controles y Tg en la exploración no estarían relacionadas con diferencias en los niveles aparentes de estrés (Prut y Belzung, 2003).

Resultados preliminares indican una marcada tendencia de aumento en los niveles de GluN1 y GluN2A en hipocampo de ratas Tg adultas jóvenes 70 min luego de la exposición a una sesión de CA. Los resultados sugieren fuertemente que, en los animales jóvenes, este mecanismo de aumento estaría conservado en los Tg.

En animales Tg de 1 año, que evidenciaron habituación en la sesión de CA de 5 min, los niveles de GluN1 y GluN2A en hipocampo no mostraron diferencias significativas entre los grupos evaluados inmediatamente y 70 min después de la tarea.

En las ratas Tg de 1 año, los niveles de GluN2A en fueron significativamente mayores que en el grupo Control en condiciones basales (C0), sugiriendo una alteración en la regulación basal de dicha subunidad. Los  $\alpha\beta$ A parecen unirse preferencialmente a los RNMDA conteniendo GluN2B, que se internalizarían en mayor proporción que los RNMDA conteniendo GluN2A; este aumento en la relación GluN2A/2B en la sinapsis podría protegerla. Y se puede especular que el aumento en el nivel de GluN2A podría resultar protector de la neurona atacada. Pero, por otra parte, un aumento considerable de la relación GluN2A/2B en las sinapsis de esa neurona, disminuirían notablemente la probabilidad de plasticidad y, en consecuencia, disminuiría la capacidad de aprendizaje.

En relación con la tendencia de aumento transitorio de GluN2A observada en Tg jóvenes, pero no en Tg de 1 año, podríamos especular que los niveles “basales” aumentados de GluN2A en animales de 1 año podrían enmascarar un cambio más sutil que, efectivamente, estuviera ocurriendo o, incluso, que los mecanismos que regularan el aumento de esta subunidad luego de habituación/plasticidad sináptica estuvieran “saturados”, impidiendo así un aumento transitorio aún mayor de esa subunidad.

Hay discrepancia en cuanto a la expresión de las subunidades del RNMDA, en relación con la EA. En el análisis de cerebros humanos *post-mortem*, se han reportado cambios en la expresión de las subunidades del RNMDA: cuando se evaluó el hipocampo completo, se evidenciaron niveles disminuidos de GluN1 y GluN2B, tanto a nivel proteico como a nivel del ARN mensajero (ARNm), a medida que avanzaba la patología. En cuanto a GluN2A, aunque los niveles proteicos permanecieron estables en los diferentes estadios de la patología, a nivel celular se evidenció aumento de la expresión del ARNm en el grupo con patología moderada (Mishizen-Eberz y col., 2004). Por otro lado, Bi y Sze (2002) reportaron disminución de GluN2A y GluN2B en hipocampo de pacientes con EA, sin cambios en GluN1, cuando evaluaron los niveles de ARNm por PCR en tiempo real (Bi y Sze, 2002).

Como se discutió previamente, varios reportes indican que la relación GluN2A/GluN2B aumentaría con la edad (Cao y col., 2007; Clayton y col., 2002; Tang y col., 1999; Tsien, 2000; Zhao y col., 2009). En ratones sobre-expresando GluN2A, Cui y col. (2013) demostraron deterioro en la formación de MLP -pero no en la formación de MCP- en el Laberinto Acuático en Cruz, el RON, el CAM y el CCM, sin evidenciar diferencias entre ratones Tg y Controles en los “comportamientos básicos” evaluados en una sesión de CA y en una sesión de Laberinto en Cruz Elevado (Cui y col., 2013). En base a estos antecedentes y a nuestros resultados, podemos especular que los déficits cognitivos observado en el LAM por Leon y col. (2010) y en el RON, la LO, el CAM y el CCM por Iulita y col. (2014), en ratas Tg McGill-R-Thy1-APP, podrían estar relacionados con los niveles “constitutivamente elevados” de GluN2A que observamos en este modelo Tg en animales de 1 año, mientras que esta alteración podría no afectar un aprendizaje espacial simple, cómo es la habituación a un CA.

En reportes previos de nuestro laboratorio, en colaboración con el laboratorio del Dr. Ferreira, hemos demostrado que los  $\alpha$  se unen al RNMDA o a complejos conteniendo este receptor (Decker y col., 2010); recientemente se ha sugerido que se unirían preferentemente a la subunidad GluN2B, provocando un gran ingreso de calcio a las neuronas debido al mayor tiempo de apertura que presenta el RNMDA-GluN2B, con respecto al RNMDA-GluN2A (Ferreira y col., 2012). Entonces, se puede especular, como ya se menciono, que el nivel aumentado de GluN2A en los Tg de 1 año, podría jugar un rol “protector” de las sinapsis y de las neuronas.

¿Podría el sistema responder incrementando los niveles totales de GluN2A, contribuyendo a proteger las sinapsis de la unión de mas  $\alpha$ ?

Por supuesto, estas suposiciones constituyen nuevas hipótesis de trabajo e implican nuevos diseños experimentales para investigar qué mecanismos estarían participando de este

aumento basal de las subunidades (¿expresión *de novo*, alteración en la degradación?) y cuál podría ser su rol.

## **LOCALIZACIÓN CELULAR DE LOS CAMBIOS EN LAS SUBUNIDADES DEL RNMDA EN UN MODELO *IN VITRO***

En nuestro laboratorio realizamos previamente ensayos electrofisiológicos en rodajas de hipocampo de ratas adultas jóvenes, induciendo LTP con el objeto de estudiar la relación LTP-aprendizaje. Cuando analizamos los niveles de subunidades del RNMDA en esos hipocampos, observamos aumento de GluN1 y GluN2A 70 min luego de la inducción de LTP (Baez y col., 2013), en el mismo sentido y con un curso temporal semejante a los aumentos aquí reportados, que tienen lugar *in vivo*, en el hipocampo de animales adultos jóvenes luego de un aprendizaje. Ya había sido reportado que la LTP indujo movilidad de los RNMDA desde el cuerpo celular y las dendritas hacia las sinapsis, como fuera revelado por el incremento de puntos de RNMDA en espinas dendríticas luego de la inducción de plasticidad (Barria y Malinow, 2002; Hoffmann y col., 2000). Sin embargo, esos cambios ocurrieron en forma inmediata o muy poco tiempo después de la inducción de LTP. Los cambios que nosotros observamos *in vivo* fueron detectados a los 70 min de la habituación, y *ex vivo*, 70 min luego de la inducción de LTP (Baez y col., 2013). Para estudiar su localización utilizamos un modelo *in vitro*. Wu y col. (2001) demostraron que exponiendo cultivos de neuronas a pulsos de KCl (estímulos despolarizantes) repetidos, se produjo una activación persistente de la vía de las quinasas MAP (MAPK). Dicha activación fue dependiente de Ras, PKA y MEK, moléculas que juegan un rol importante en la LTP (Brambilla y col., 1997; English y Sweatt, 1997; Huang y col., 1994; Impey y col., 1998). La activación de esta vía en dendritas fue crítica para la formación de nuevos filopodios dendríticos estables por horas. De esta manera, la estimulación por pulsos de KCl produjo cambios símil-plásticos en los cultivos (Wu y col., 2001).

En este modelo de neuronas en cultivo, hemos observado por inmunocitoquímica, un aumento de los puntos correspondientes a GluN1 y GluN2A en las dendritas, 30 min después de la estimulación. El hecho de no haber observado cambios en la inmunofluorescencia total a los 30 min, permite inferir que el aumento de puntos en las dendritas sería consecuencia de una relocalización de subunidades pre-existentes en el *pool* subsináptico (Barria y Malinow, 2002; Yin y col., 2012) y de la inserción de RNMDA-GluN2A en la membrana. A los 70 min de la

estimulación también hubo un aumento de los puntos para GluN1 y GluN2A en las dendritas, y también hubo aumento de la inmunofluorescencia total. Es decir que estos cambios podrían requerir de síntesis proteica. El aumento concomitante de los puntos en las dendritas y de la inmunofluorescencia total, sugiere fuertemente el ensamble y la expresión en membrana de nuevos RNMDA-GluN2A a los 70 min. En concordancia con estos resultados, Grosshans y col. (2002) observaron que, luego de la inducción de LTP en rodajas de hipocampo de ratas adultas, se producía en las dendritas un incremento rápido y persistente (hasta 3 h) de las subunidades GluN1 y GluN2A, pero no de GluN2B, con una disminución concomitante de los niveles intracelulares 30 min luego de la inducción de LTP. Entonces, esos cambios en la composición de los RNMDA fueron atribuidos a un intercambio dinámico entre los *pools* no sinápticos y/o extra-sinápticos, y el *pool* sináptico, ya que no se evidenciaron cambios en los niveles totales del RNMDA (Grosshans y col., 2002).

Por otro lado, se sabe que en cultivos maduros de neuronas (22-30 DIVs), la actividad de los RNMDA reprime la traducción de GluN2B, mientras que el bloqueo prolongado de los RNMDA libera dicha represión (Chen y Bear, 2007). Así, nuestros resultados concuerdan con el hecho de que la actividad neuronal facilitaría la expresión de GluN2A y reprimiría la traducción de GluN2B en neuronas maduras, llevando a un aumento de la relación GluN2A/GluN2B en respuesta a la actividad neuronal. En conjunto, estos datos permiten especular que la actividad en las sinapsis excitatorias protegería a las neuronas y circuitos involucrados.

En el modelo utilizado -cultivo de neuronas estimuladas por pulsos repetidos de KCl-, en el que se han reportado cambios *símil-LTP*, el aumento de puntos de GluN1 y de GluN2A en dendritas 70 min luego de la estimulación, muestra otro cambio “plástico” más (además de los ya observados en este modelo por otros autores), en concordancia con los resultados obtenidos *in vivo* en animales adultos jóvenes luego de aprendizaje, tanto en la dirección de los cambios (aumento de GluN1 y GluN2A) como en el curso temporal (70 min post-estimulación), como ya se dijo.

Además, en los ensayos electrofisiológicos en rodajas de hipocampo mencionados previamente, comprobamos que, para que se verificara el aumento en las subunidades luego de inducción de LTP, era necesaria la síntesis de proteínas (condición necesaria pero no suficiente) (Baez y col., 2013); también se demostró que se requiere de la inducción y el efectivo establecimiento de LTP, para que tenga lugar el cambio en las subunidades, ya que la mera estimulación para la inducción, sin establecimiento de LTP, no dio lugar a dicho aumento. Por otra parte, los resultados con un inhibidor de la traducción (actinomicina-D), indican que

se requiere de expresión *de novo* de GluN1 para que se verifique el aumento en esta subunidad. Así, el aumento de GluN1 luego de la LTP depende de transcripción y traducción, mientras que el aumento de GluN2A depende de traducción, pero no requiere de transcripción (Baez y col., 2013).

Entonces, en los modelos *ex vivo* e *in vitro* estudiados en nuestro laboratorio (rodajas frescas de hipocampo y cultivos de neuronas), también hubo concordancia de los resultados, así como con los obtenidos en el modelo *in vivo* luego de aprendizaje en animales adultos jóvenes.

Los resultados obtenidos *in vivo* en animales de 1 año sugieren que el mecanismo por el cual se produce aumento de GluN1 y GluN2A luego de habituación, podría estar modificado en el envejecimiento, y que dicho aumento no sería un mecanismo requerido para la formación de la MLP de habituación.

## **CAMBIOS SIMILARES DE LAS SUBUNIDADES DEL RNMDA EN LOS DISTINTOS MODELOS EXPERIMENTALES**

En los dos modelos estudiados, GluN1 y GluN2A aumentaron notablemente entre los 30 y los 70 min luego de la inducción de plasticidad, en neuronas de hipocampo en cultivo o luego de la exposición de una rata al CA, mientras que no se observaron cambios en GluN2B. Esto ocurrió *in vivo*, en el hipocampo de ratas adultas jóvenes, e *in vitro*, en cultivos maduros de neuronas de hipocampo. Aunque estos aumentos fueron similares, y siguieron un curso temporal semejante, es necesario realizar otros estudios para develar si los mecanismos involucrados en cada caso, reflejan procesos relacionados y para descubrir si están causalmente relacionados con plasticidad sináptica, aprendizaje y memoria.

Cambios en las subunidades del RNMDA fueron descritos inicialmente durante el desarrollo post-natal temprano en mamíferos (Barth y Malenka, 2001; Klann y Sweatt, 2008; Quinlan y col., 1999), cuando cambia la predominancia de RNMDA-GluN2B a RNMDA-GluN2A en telencéfalo, debido a la expresión diferencial de las subunidades del RNMDA (ver Yashiro y Philpot, 2008). Estos cambios se desarrollan lentamente en el curso de varios días y son dependientes de transcripción, traducción y actividad (Barria y Malinow, 2002). En rodajas de hipocampo de rata se han encontrado diferentes mecanismos dependientes de actividad, que regulan la localización de cada subunidad del RNMDA. En general, la actividad lleva a un

aumento de la subunidad GluN2A y una disminución en la presencia de GluN2B a nivel de la membrana sináptica, como fuera demostrado por cambios en la cinética de las corrientes en registros de fijación de voltaje (*voltage-clamp*), en cultivos organotípicos o en rodajas frescas (Barria y Malinow, 2002; Bellone y Nicoll, 2007; Foster y col., 2010; Lau y Zukin, 2007; Yin y col., 2011). Estos incrementos en la relación GluN2A/GluN2B ocurren muy rápidamente y parecen independientes tanto de la síntesis de proteínas como de la expresión génica (Bellone y Nicoll, 2007; Lau y Zukin, 2007).

Ha habido reportes controversiales en cuanto a la función de los subtipos de RNMDA en la inducción y mantenimiento de plasticidad sináptica. Los RNMDA-GluN2B parecen ser necesarios para la inducción de LTP; presentan mayor afinidad por la CaMKII que GluN2A (Strack y Colbran, 1998) y una mayor capacidad para llevar el doble de cargas para un evento sináptico único (Dravid y col., 2007; Sobczyk y col., 2005). Sin embargo, fue reportado que el bloqueo selectivo de los RNMDA-GluN2B impidió la inducción de LTD pero no la de LTP (Brigman y col., 2010; Ge y col., 2010). En contraste, la inhibición preferencial de los RNMDA-GluN2A previno la inducción de LTP (Liu y col., 2004). Pero Foster y col. (2010) sugirieron que un exceso de GluN2A podría inhibir la inducción de LTP en rodajas de hipocampo en cultivo. Más aún, ha sido reportado que la activación de RNMDA-GluN2B, pero no de RNMDA-GluN2A, produce excitotoxicidad y muerte celular (Taghibiglou y col., 2009). Así, un incremento en la relación GluN2A/GluN2B podría actuar como neuroprotector.

## RELEVANCIA DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

Hemos demostrado que luego de una experiencia (*in vivo*), de exploración de un ambiente nuevo, con habituación al mismo, así como luego de la estimulación de neuronas en cultivo (*in vitro*), por pulsos repetidos de KCl, hubo un aumento significativo de los niveles de GluN1 y GluN2A, evidente a los 70 min, coincidiendo con resultados de nuestro laboratorio en rodajas frescas de hipocampo (Baez y col., 2013). Este aumento no se observó en animales de 1 año aún habiendo MT y formación de MLP.

Nuestros resultados abren varias preguntas acerca de la relevancia funcional de estos cambios en las subunidades del RNMDA:

¿Los incrementos en GluN1 y GluN2A estarían relacionados con el establecimiento/persistencia de la plasticidad sináptica, por ejemplo, contribuyendo a la transición de una LTP temprana a una LTP tardía, en algún momento luego de la inducción?

¿Podría ser el incremento en la relación GluN2A/GluN2B una consecuencia adaptativa compensatoria/homeostática una vez que la sinapsis sufre algún cambio plástico como la potenciación, por ej., disminuyendo la probabilidad de plasticidad sináptica posterior o incluso, de excitotoxicidad?

¿Estaría afectado por el envejecimiento el mecanismo involucrado en este fenómeno?

¿Los valores aumentados de GluN2A en los animales Tg estarían relacionados con algún mecanismo de compensación/protección, como una forma de evitar el ataque de los  $\alpha$  a las neuronas?



## **CAPÍTULO II**

### Desarrollo de vectores virales neurotrópicos

---



## INTRODUCCIÓN

---



## VECTORES AMPLICÓN COMO HERRAMIENTAS PARA EL ESTUDIO DE LAS SUBUNIDADES DEL RNMDA

El rol de los RNMDA del hipocampo en plasticidad sináptica y su relación con memoria y aprendizaje, han sido estudiados mediante bloqueo farmacológico y manipulación genética, incluyendo *knockout* (KO) condicional de la subunidad GluN1 en neuronas de CA1 (McHugh y col., 1996; Tsien y col., 1996). Sin embargo, a pesar de ser condicionado, este KO no quedó restringido al hipocampo, además de haber comenzado tempranamente en la vida de los animales.

Los agentes farmacológicos disponibles para estudiar el rol de las distintas subunidades del RNMDA no son suficientemente selectivos. En consecuencia, distintos receptores, en muchas células y sinapsis, resultan bloqueados por dichos fármacos, imposibilitando un análisis discriminado (Köhr, 2006). Estos antecedentes denotan la necesidad de desarrollar nuevas herramientas que permitan un estudio selectivo de los subtipos de RNMDA, a través de su modificación de manera estable y selectiva, que pueda ser restringida en el tiempo y el espacio.

Los vectores amplicón, derivados del virus herpes simplex tipo 1 (HSV-1), son herramientas valiosas para el estudio del rol de genes y proteínas específicas. Estos vectores han sido manipulados genéticamente para carecer de secuencias génicas virales por lo que, en general, no resultan tóxicos para las células. Los efectos citopáticos son limitados y la respuesta inmune es leve cuando se los emplea en dosis adecuadas (Costantini y col., 1999; Fraefel y col., 1996; Olschowka y col., 2003; Tsitoura y col., 2009). Pueden albergar insertos de hasta 150 kpb de ADN, tienen elevada estabilidad y permiten obtener producciones de vectores con altos títulos ( $10^8$  vectores/ml) (Breakefield y col., 1995; Glorioso y col., 1995; Jacobs y col., 1999; Simonato y col., 2000). Son neurotrópicos *in vivo* y son útiles y eficientes para la transferencia de genes tanto *in vitro* como *in vivo* (Cuchet y col., 2007; Sena-Esteves y col., 2000). Por estas ventajas, han sido utilizados *in vivo*, en estudios de funciones cognitivas (Cheli y col., 2006; Jerusalinsky y Epstein, 2006), terapia para el cáncer y vacunación (Blanc y col., 2012; Cuchet y col., 2005; Gorantla y col., 2005; Ho y col., 2010; Laimbacher y col., 2012; Melendez y col., 2013). En nuestro equipo hemos construido vectores amplicón conteniendo secuencias de ADN capaces de expresar un ARN antisentido contra GluN1, que permitieron disminuir los niveles de la subunidad GluN1 en regiones discretas del cerebro de ratas, como en el hipocampo dorsal, con infusiones locales de dichos vectores. Los animales inyectados con

el vector GluN1 portador de la secuencia para ARN antisentido, mostraron un deterioro notable en la capacidad para aprender/recordar cuando se evaluó su desempeño en tareas comportamentales (Adrover y col., 2003; Cheli y col., 2002, 2006) .

## EL VIRUS HERPES SIMPLEX TIPO-1

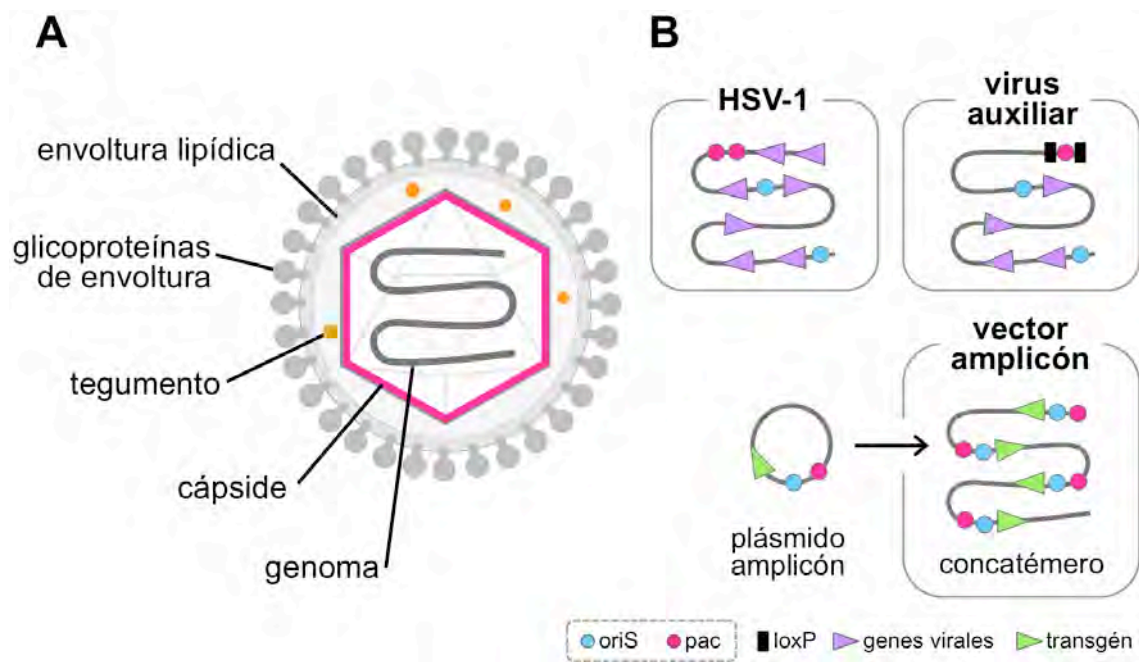
El HSV-1 es un virus envuelto de ADN de doble cadena (ADNdc), de 220 nm de diámetro, altamente complejos (Grünwald y Cyrklaff, 2006). El virión maduro de HSV-1 se compone de la siguiente manera:

- **Genoma:** es una molécula de ADNdc lineal
- **Cápside icosaédrica**
- **Tegumento:** una capa de proteínas localizada entre la envoltura y la cápside. Estas proteínas cumplen un rol crítico en la morfogénesis del virión, y también ayudan al virus a tomar el control de la maquinaria de expresión de la célula tempranamente luego de la infección.
- **Envoltura lipídica de origen celular,** donde se encuentran glicoproteínas y otras proteínas de membrana, muchas de ellas involucradas en la entrada a la célula, mediada por receptores.

El ADNdc lineal de 152 kpb, densamente empaquetado en la cavidad de la cápside (Zhou y col., 1999) y carece de proteínas histonas en esta etapa (Oh y Fraser, 2008). Este genoma está dispuesto como segmentos únicos largo (UL) y corto (US), de 126 kpb y 26 kpb, respectivamente. Los segmentos UL y US se encuentran flanqueados por secuencias repetidas, designadas ab, b'a', a'c' y ca (o TRL, IRL, IRS y TRS, del inglés *Terminal Repeat L*, *Internal Repeat L*, *Internal Repeat S* y *Terminal Repeat S*, respectivamente) (ref 6).

El genoma del HSV-1 ha sido completamente secuenciado (McGeoch y col., 1988, 1986, 1985). Codifica al menos 84 genes virales, que pueden ser divididos en genes esenciales y no-esenciales, según su expresión sea necesaria o no para el crecimiento viral en cultivos de células permisivas. Los genes HSV-1 no contienen secuencias intrónicas, a excepción de aquellos codificando ICP0, ICP22, ICP47, UL15 y LAT. Los genes no-esenciales en general

codifican funciones que son importantes para la interacción específica virus-hospedador *in vivo*, tales como la evasión de la respuesta inmune, la replicación en células quiescentes o la inhibición de la síntesis de proteínas del hospedador. Se ha demostrado que aproximadamente la mitad de los genes virales son dispensables para la replicación del virus en cultivos celulares, y así, estos genes podrían ser reemplazados por material genético exógeno, la cual ha sido la premisa para el desarrollo de vectores derivados de HSV-1 para terapia génica (de Silva y Bowers, 2009). Son esenciales la mayoría de los genes involucrados en la entrada del virus a la célula, la replicación del ADN, el ensamblado de la cápside y el empaquetado del ADN.



**Figura 21. Estructura y genoma del HSV-1 y de sus partículas virales derivadas.** **A.** Esquema de la estructura general del virus HSV-1 y de sus partículas virales derivadas: virus auxiliar LaΔJ y vector amplicón. Las tres partículas comparten los elementos estructurales: envoltura lipídica con proteínas de envoltura, tegumento y cápside. El genoma consiste en una hebra de ADNdc lineal de aproximadamente 150 kpb, con diferentes características en cada caso. **B.** El genoma del HSV-1 salvaje codifica al menos 84 genes virales y posee orígenes de replicación y secuencias de corte/empaquetado (pac). El genoma del virus auxiliar LaΔJ, derivado del genoma del HSV-1 salvaje, carece del gen que codifica la proteína ICP4 - esencial para la replicación viral, por lo que el virus auxiliar HSV-1 LaΔJ es defectivo para la replicación- así como del gen que codifica el factor de neurovirulencia ICP34.5; la secuencia pac se encuentra flanqueada por secuencias loxP, lo que permite la eliminación de pac por recombinación por la recombinasa CRE en un sistema celular adecuado. El genoma de un vector amplicón es un concatémero de copias cabeza-cola derivado del plásmido amplicón. Un plásmido amplicón contiene dos secuencias presentes en el genoma viral: un origen de replicación (generalmente oriS) y la secuencia pac -el "módulo amplicón"-, puede contener uno o más transgenes de interés, y contiene secuencias para la amplificación y selección en bacterias (no esquematizadas). El genoma de un vector amplicón no contiene genes virales.

El genoma HSV-1 contiene dos secuencias *cis* que son esenciales para la multiplicación viral: los orígenes de replicación de ADN viral y las señales de corte/empaquetado. El HSV-1

contiene 3 orígenes de replicación líticos, 2 de ellos localizados cerca de los segmentos repetidos US (oriS) y 1 en el segmento UL (oriL) (Vlazny y Frenkel, 1981). Virus mutantes sin oriL o sin ambas copias de oriS son competentes para la replicación, sugiriendo que todos los orígenes son funcionalmente competentes (Bataille y Epstein, 1995).

La señal de corte/empaquetado del genoma del HSV-1 se localiza en la secuencia  $\alpha$ , generalmente en repeticiones en tándem (Davison y Wilkie, 1981). En diferentes cepas HSV-1, la secuencia  $\alpha$  abarca entre 250 y 500 pb. Se ha demostrado que un fragmento de aproximadamente 200 pb abarcando la unión entre las secuencias  $\alpha$  en tándem contiene todas las secuencias *cis* esenciales necesarias para el corte/empaquetado del ADN (Nasseri y Mocarski, 1988). Estas señales específicas, llamadas pac1 y pac2, se localizan en las regiones Ub y Uc, respectivamente (Deiss y col., 1986; McVoy y col., 1998; Nasseri y Mocarski, 1988).

## VECTORES DERIVADOS DEL HSV-1

El HSV-1 presenta tropismo epitelial natural, altamente adaptado al entorno del sistema nervioso del organismo hospedador, por lo que los vectores derivados de HSV-1 son mayormente utilizados para infectar neuronas y células gliales. El HSV-1 posee varias características que hacen que sus partículas derivadas sean especialmente interesantes como vectores:

- Aunque es esencialmente neurotrópico, en condiciones experimentales el HSV-1 presenta un amplio tropismo, debido a que su receptor celular está ampliamente distribuido. Además, el HSV-1 infecta y se replica en células de varios mamíferos, lo que facilita la evaluación preclínica.
- Puede infectar células en división y quiescentes.
- En general causa enfermedades no mortales.
- Aproximadamente la mitad del genoma es no-esencial en células en cultivo. Los genes no esenciales pueden ser eliminados sin comprometer la replicación viral, dejando lugar para albergar cantidades considerables de ADN transgénico en la cápside, permitiendo incluir múltiples transgenes o transgenes de gran tamaño.
- Los vectores HSV-1, deficientes para la replicación, pueden ser producidos con altos títulos.



- La habilidad para establecer un estado latente en neuronas puede ser muy útil para la expresión de los transgenes terapéuticos a largo plazo.
- El genoma HSV-1 no se integra en los cromosomas del hospedador, manteniéndose en forma episomal y reduciendo el riesgo de mutagénesis insercional.

Spaete y Frenkel (Spaete y Frenkel, 1982) reportaron la generación natural de genomas HSV-1 completamente defectivos, que carecían de casi todos los genes *trans*. Estos genomas defectivos estaban formados principalmente por repeticiones de las dos secuencias no-codificantes del HSV-1: los orígenes de replicación del ADN y las señales de corte/empaquetado. Es más, demostraron que estos genomas defectivos se podían replicar y empaquetar en partículas en presencia de un virus auxiliar que aportara todas las funciones virales en *trans*, demostrando así que los orígenes de replicación y las secuencias de corte/empaquetado eran las únicas secuencias *cis* requeridas para la replicación y el empaquetado de un genoma de virus defectivo. Esas secuencias *cis* del genoma HSV-1 fueron incorporadas en un plásmido bacteriano estándar, que llamaron plásmido amplicón (Spaete y Frenkel, 1982), y demostraron que el plásmido amplicón podía también ser replicado y empaquetado en partículas virales en presencia de un sistema auxiliar, generando así lo que llamaron vectores amplicón.

## Vectores amplicón

Un plásmido amplicón convencional consiste en (i) un plásmido base conteniendo un origen de replicación de ADN bacteriano y un gen de resistencia a un antibiótico, que permiten su amplificación y selección en bacterias, (ii) un origen de replicación de ADN HSV-1 (generalmente *oriS*), (iii) una secuencia de corte/empaquetado del HSV-1 (*pac* o *a*), (iv) una unidad de transcripción expresando una proteína reportera, generalmente codificando la proteína verde fluorescente (EGFP) -útil para identificar las células infectadas por los vectores y que facilita la titulación de las producciones de vectores-, y (v) un sitio de clonado múltiple para introducir el o los transgenes de interés (Spaete y Frenkel, 1982).

Los transgenes de interés pueden ser clonados en el plásmido amplicón mediante técnicas de clonado convencional. El plásmido resultante puede ser empaquetado en partículas virales para ser usado para transducir células o tejidos. Desde el punto de vista estructural e inmunológico, los vectores amplicón son partículas virales idénticas a las

partículas HSV-1 salvajes. La diferencia está en su genoma: el genoma de un vector amplicón es un concatémero de copias del plásmido amplicón en un arreglo cabeza-cola, producto de la replicación del plásmido amplicón por el mecanismo del círculo rodante (ver **Figura 21**, página 77).

Los vectores amplicón han sido utilizados tanto en investigación básica como aplicada, permitiendo estudiar funciones complejas del SNC como ansiedad, comportamiento sexual, aprendizaje y memoria. Además, los vectores amplicón están siendo utilizados para el desarrollo de nuevas estrategias de terapia experimental contra enfermedades hereditarias y adquiridas que afectan al sistema nervioso, incluyendo enfermedades neurodegenerativas (Jerusalinsky y col., 2012; Marconi y col., 2010; Zhang y Geller, 2010; Zou y col., n.d.), desarrollo de vacunas (Blanc y col., 2012; Laimbacher y col., 2012), vectores virales híbridos (como los virus adeno-asociados -AAV- y lentivirus) (de Oliveira y Fraefel, 2010; Saydam y col., 2012), tecnología de cromosomas artificiales humanos (Mandegar y col., 2011; Moralli y col., 2006) e investigación básica. Varias revisiones tratan las características y las aplicaciones de los vectores amplicón (ver Cuchet y col., 2007; ver de Silva y Bowers, 2009; ver Epstein, 2009; ver Fraefel, 2007; ver Manservigi y col., 2010).

El sistema amplicón posee varias propiedades que lo hacen efectivo y eficiente como método para la transferencia de genes:

- Los dos elementos del HSV-1 requeridos para permitir la replicación y el empaquetamiento en viriones (las secuencias oriS y pac, o “módulo amplicón”), comprenden menos de 1 kpb. Ya que la partícula del HSV-1 puede empaquetar hasta 153 kpb, esto implica que una partícula amplicón podría acomodar largos fragmentos de ADN exógeno, incluyendo múltiples transgenes, transgenes largos o secuencias regulatorias largas. Esta es la característica más sobresaliente de los vectores amplicón, ya que no existe otro sistema de vectores virales que tenga la capacidad de transducir esa cantidad de ADN (aproximadamente 150 kpb) en células de mamíferos (los vectores adenovirales pueden acomodar hasta 30 kb, los vectores retrovirales y lentivirales pueden acomodar hasta 9-10 kb, y los vectores adeno-asociados pueden acomodar hasta 4 kb (Nev y col., 2005; Sena-Esteves y col., 2000).
- Dependiendo del tamaño del plásmido amplicón, se pueden empaquetar varias copias del transgén en una única partícula (Kwong y Frenkel, 1984), incrementando de esta

manera la dosis transgénica por célula infectada. Esto se debe a que la replicación del genoma amplicón se realiza mediante el mecanismo de círculo rodante mono-direccional, generando largos concatémeros compuestos por repeticiones en tándem del plásmido amplicón, y a que cada partícula HSV-1 siempre corta y empaqueta una molécula de ADN de aproximadamente 150 kpb, que representa la capacidad de empaquetado del HSV-1 (Boehmer y Lehman, 1997).

- Aunque el genoma amplicón no contiene genes virales y por lo tanto no induce la síntesis de proteínas virales, las proteínas estructurales del HSV-1 (aproximadamente 40) que forman el virión HSV-1 (las mismas que forman el virión amplicón) están presentes durante la infección y pueden entonces desencadenar señalización celular y respuestas celulares, probablemente con un impacto en la homeostasis celular y en la expresión de genes. Sin embargo, estas proteínas desaparecen rápidamente y la célula puede volver a sus funciones normales, incluyendo la habilidad de dividirse y de responder a estímulos fisiológicos. Es más, la ausencia de genes virales en el genoma amplicón reduce marcadamente el riesgo de reactivación, complementación o recombinación con genomas HSV-1 latentes o residentes.
- Luego de la infección primaria en células epiteliales, las partículas virales pueden entrar a las terminales de nervios sensoriales y la cápside es movilizada vía transporte retrógrado axonal hacia el cuerpo de las neuronas del ganglio sensorial, donde el virus puede establecer una infección latente. La mayoría de estos mecanismos pueden ser reproducidos por los vectores amplicón, ya que las partículas maduras son idénticas a las del virus auxiliar y por lo tanto se comportarán como partículas virales normales. Sin embargo, no está claro aún si el genoma amplicón puede establecer una expresión a largo plazo símil- latencia en neuronas sensoriales.
- Una vez empaquetados en partículas virales, los vectores amplicón mantienen la habilidad de infectar numerosos tipos celulares, y su genoma se mantiene en forma episomal en el núcleo de la célula infectada. Debido a la ausencia de expresión de genes virales, el amplicón es defectivo para la replicación, y su existencia como episoma produce un mantenimiento estable en células post-mitóticas, pero produce una segregación desigual en células en mitosis activa. Debido a que el genoma amplicón no se integra en el genoma del hospedador, los vectores amplicón convencionales no producen mutagénesis insercional, aumentando así la seguridad de estos vectores para su aplicación en terapia génica.

## VECTORES AMPLICÓN COMO UNA POSIBLE ESTRATEGIA TERAPÉUTICA CONTRA LA EA

El ataque de los o $\beta$ A a las neuronas se postuló como un “blanco” fundamental para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas contra la EA (Ferreira y Klein, 2011; Ferreira y col., 2007). La inhibición directa de la producción de  $\beta$ A para reducir los o $\beta$ A tóxicos *in vivo*, ha resultado una estrategia arriesgada y compleja ya que, además, esta molécula cumpliría varias funciones fisiológicas importantes (Giuffrida y col., 2009; Puzzo y col., 2011, 2008). Entonces, estimular los mecanismos de depuración por inmunoterapia anti- $\beta$ A se presentó como una estrategia promisorio. Algunos candidatos basados en esta estrategia ya fueron o están siendo sometidos a ensayos clínicos. Un ensayo usando como vacuna el mismo péptido  $\beta$ A, dio lugar a producción significativa de anticuerpos anti- $\beta$ A, pero provocó meningoencefalitis en 6% de los pacientes tratados, posiblemente inducida por la respuesta inmune mediada por células T, lo que llevó a cancelar los ensayos (Orgogozo y col., 2003). Resultados alentadores con inmunización pasiva con anticuerpos anti- $\beta$ A inyectados sistémicamente o directamente en el cerebro, abrieron el camino para ensayos clínicos. Esos anticuerpos anti- $\beta$ A fueron capaces de bloquear, e incluso revertir, la toxicidad asociada a  $\beta$ A tanto *in vitro* como en modelos animales (Dodart y col., 2002; Klyubin y col., 2008; Kotilinek y col., 2002). Sin embargo, todas las inmunoglobulinas G (IgG) anti- $\beta$ A sometidas a ensayos clínicos fallaron en producir mejoría cognitiva significativa en los pacientes, a diferencia de lo observado en modelos animales. Una posible explicación es que, como los anticuerpos anti- $\beta$ A, no siendo sensibles a conformación, reconocieron el  $\beta$ A en todas las conformaciones (incluyendo monómeros y fibras), esto pudo haber reducido significativamente los niveles de anticuerpo disponible para interactuar con los o $\beta$ A en los tejidos “blanco”. Otros factores relevantes que podrían haber afectado el desarrollo de los ensayos clínicos usando IgG anti- $\beta$ A son: la inducción de respuesta inflamatoria indeseable por la porción no variable -Fc- del anticuerpo (Wilcock y col., 2004), y la baja permeabilidad de la barrera hemato-encefálica a las IgG (Pardridge, 2009).

Decidimos desarrollar vectores virales neurotrópicos, como herramientas que nos permitieran enviar transgenes al SNC (Cuchet y col., 2007; Jerusalinsky y col., 2012). Por un lado, nos propusimos desarrollar una herramienta para atenuar los efectos deletéreos de los o $\beta$ A *in vivo*, como una posible terapia experimental contra la EA. Por otro lado, nos propusimos desarrollar vectores para afectar la expresión de las subunidades del RNMDA con

restricción espacial y temporal, siendo esta alta selectividad y la detección de las células afectadas, ventajas que presentan estos vectores virales con respecto a los agentes farmacológicos clásicos.

Estos vectores harían posible el estudio del rol de las subunidades regulatorias del RNMDA mayoritarias en estructuras relacionadas con procesamiento cognitivo, GluN2A y GluN2B, por ejemplo en hipocampo, considerando la relevancia de dicha estructura en la formación de memorias (Jarrard, 1993; Zola y Squire, 2001) y su importancia en neuropatologías como la EA (Walsh y Selkoe, 2004; Walsh y col., 2002).



## OBJETIVOS

---





## OBJETIVOS GENERALES

Decidimos desarrollar vectores virales neurotrópicos, como herramientas que nos permitieran enviar transgenes al SNC (Cuchet y col., 2007; Jerusalinsky y col., 2012) afectando exclusivamente la expresión de las subunidades del RNMDA en ciertas neuronas, con restricción espacial y temporal, siendo esta alta selectividad y la detección de las células afectadas, ventajas que presentan estos vectores virales con respecto a los agentes farmacológicos clásicos.

Estos vectores harían posible el estudio del rol de las subunidades regulatorias del RNMDA mayoritarias en estructuras relacionadas con procesamiento cognitivo, GluN2A y GluN2B, por ejemplo en hipocampo, considerando la relevancia de dicha estructura en la formación de memorias (Jarrard, 1993; Zola y Squire, 2001) y su importancia en neuropatologías como la EA (Walsh y col., 2002; Walsh y Selkoe, 2004).

Por otro lado, nos propusimos desarrollar una herramienta que permita atenuar los efectos deletéreos de los o $\beta$ A *in vivo*, como una posible terapia experimental contra la EA. Con este fin, nos propusimos desarrollar vectores amplicón para expresar un scFv, específico contra o $\beta$ A (Velasco y col., 2012), en los sitios de producción y/o acumulación de dichos oligómeros, para evitar o disminuir los efectos deletéreos desencadenados por la unión de o $\beta$ A a neuronas.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1. Desarrollar vectores virales de tipo amplicón que permitan enviar genes al SNC para modificar la expresión de las subunidades regulatorias GluN2A y GluN2B del RNMDA.**
  - a. Desarrollar vectores amplicón eficientes para expresar y para disminuir la expresión de las subunidades GluN2A y GluN2B.**
    - i. Construir plásmidos amplicón, que luego constituirán el genoma de los vectores virales amplicón, incluyendo:
      1. plásmidos que expresen en orientación sentido las subunidades GluN2A y GluN2B, para expresar dichas subunidades.

2. plásmidos que expresen secuencias de ARN AS contra las subunidades GluN2A y GluN2B, para producir una disminución de la expresión de las subunidades.
  - ii. Producir *stocks* de vectores amplicón (a partir de los plásmidos construidos) que puedan ser utilizadas *in vitro* e *in vivo*, para lo cual deben presentar alto título y baja contaminación con virus auxiliar.
  - iii. Evaluar la capacidad de los vectores amplicón producidos para expresar y para disminuir la expresión de las subunidades *in vitro*.
- b. **Investigar el rol de las subunidades GluN2A y GluN2B en la formación de memorias dependientes de hipocampo, utilizando como herramientas los vectores amplicón desarrollados *ad hoc*.**
  - c. **Evaluar la formación de memorias en ratas inoculadas con los vectores amplicón desarrollados para producir el KD de cada subunidad y con vectores CTL**
    1. en la tarea de CA.
    2. en la tarea de EI.
  - d. **Verificar la eficiencia de la infección con vectores amplicón AS para producir un KD de las subunidades GluN2A y GluN2B en hipocampo de las ratas inoculadas.**
2. **Desarrollar una herramienta que permita atenuar los efectos deletéreos de los o $\beta$ A *in vivo* como una posible terapia experimental contra la EA.**
    - a. **Desarrollar vectores amplicón que expresen un scFv específico contra o $\beta$ A en los sitios de producción y/o acumulación de dichos oligómeros, para evitar o disminuir los efectos deletéreos desencadenados por la unión de o $\beta$ A a neuronas.**
      - i. Construir plásmidos amplicón que expresen el scFv NUsc1 -específico contra o $\beta$ A- intracelular y extracelularmente.
      - ii. Producir *stocks* de vectores amplicón (a partir de los plásmidos construidos), para ser utilizados *in vitro* e *in vivo*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

---



## DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS

### Estrategia general de clonado

A partir de un plásmido conteniendo una secuencia de interés, se extrae dicha secuencia (que constituye el “inserto”) por digestión utilizando enzimas de restricción específicas (“digestión”), o amplificando dicho inserto por reacción en cadena de la polimerasa (PCR, ver sección PCR), usando cebadores específicos. Un par de oligonucleótidos hibridados (ver sección Hibridación de oligonucleótidos) también puede constituir un inserto.

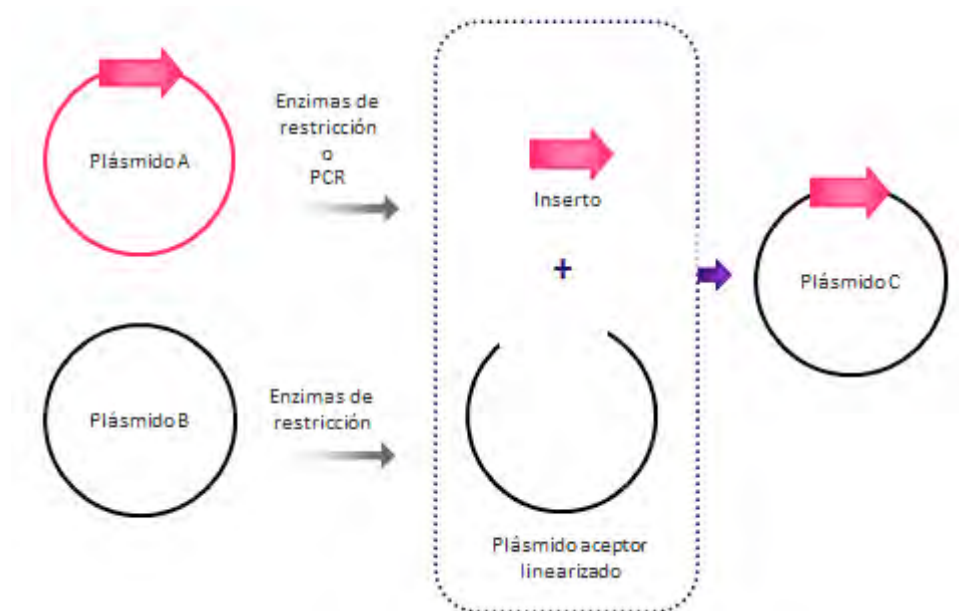
Por otro lado se obtiene el plásmido aceptor, al que se ligará el inserto. En general, el plásmido aceptor contiene una secuencia que codifica la resistencia a un antibiótico (permitiendo la posterior selección de las bacterias conteniendo el plásmido). El plásmido aceptor se abre por digestión con enzimas de restricción específicas. Si la digestión genera extremos no compatibles, esto aumenta la probabilidad de obtener una correcta orientación del inserto en el plásmido aceptor y disminuye la probabilidad de que el plásmido aceptor se circularice sin incorporar el inserto. De ser posible, siempre se prefieren los extremos cohesivos antes que los romos.

Tanto para el inserto como para el plásmido aceptor, se aíslan los fragmentos de interés por migración en gel de agarosa 0,5%-1,5%, dependiendo del tamaño de los fragmentos. Con la ayuda de un transiluminador (BioRad) se identifica la banda correspondiente al peso molecular adecuado y se extrae la porción de gel conteniendo la banda de interés. Luego se extrae el ADN del gel utilizando un *kit* comercial (*Nucleospin Gel and PCR Clean-up*, Macherey-Nagel) según las indicaciones del fabricante.

Una vez obtenidos los fragmentos, se ligan el plásmido aceptor y el inserto, por incubación durante 16 horas a 4 °C, de los fragmentos con la enzima T4 DNA ligasa en el *buffer T4 DNA ligase* (NEB), completando con agua hasta un volumen final de 10 µl.

En la **Figura 22** se esquematiza la estrategia general de clonado.

Se realiza un control de ligación en el que se reemplaza el inserto por el mismo volumen de agua. Este control permite evaluar la cantidad de plásmido aceptor que se liga “vacío”, es decir, sin incorporar el inserto.



**Figura 22. Estrategia general de clonado.** A partir de los plásmidos “A” y “B”, se obtienen el inserto y el plásmido aceptor linealizado. Estos fragmentos se ligan para conformar el plásmido de interés “C”.

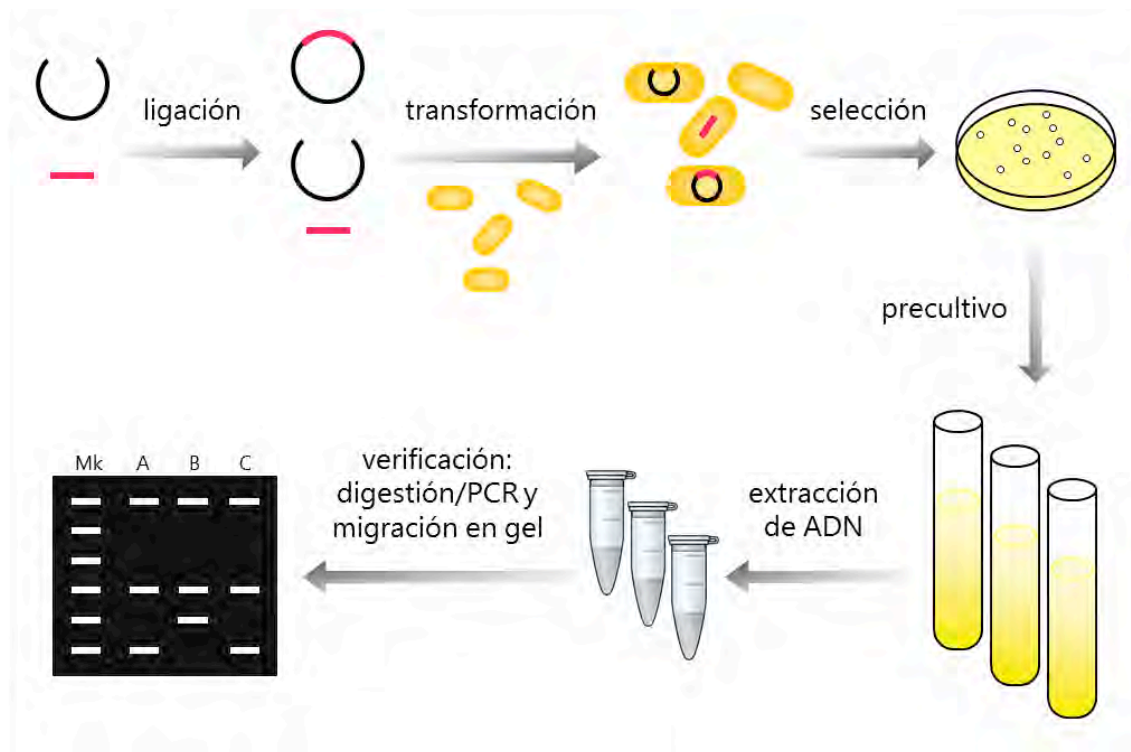
Una vez finalizada la ligación del plásmido aceptor y el inserto, el DNA se incorpora en bacterias altamente competentes (NEB-5-alpha, NEB), por transformación. Brevemente, se agrega 1 µl del producto de ligación a una suspensión de bacterias altamente competentes (NEB-5-alpha, Biolabs). Se incuba en hielo por 30 min. Se aplica un choque térmico de exactamente 30 seg a 42 °C y luego se incuba por 5 min en hielo. Se agrega 200 µl de medio SOC (NEB) y incuba en agitación a 37 °C para permitir la expresión de la resistencia al antibiótico correspondiente, si la hubiese. Luego se siembra la suspensión de bacterias en placas de agar Luria-Bertani (LB) con antibiótico, para realizar la selección de las bacterias que contengan plásmidos que expresen la resistencia al antibiótico. Se sellan las placas con Parafilm y se incuban por 16 horas a 37 °C. Este proceso se realiza paralelo en placas sembradas con 1 µl del control de ligación.

Al día siguiente se compara la cantidad de colonias presentes en la placa con inserto, con las presentes en la placa control. Si en la placa con inserto es mayor la cantidad de colonias, se procede a amplificar unas 12 colonias en tubos individuales con LB líquido y antibiótico (“precultivos”), que se incuban por 16 horas a 37 °C en continua agitación.

Al día siguiente se seleccionan los precultivos que evidencien crecimiento bacteriano, por observación macroscópica de la turbidez del medio. A partir de una alícuota de estos

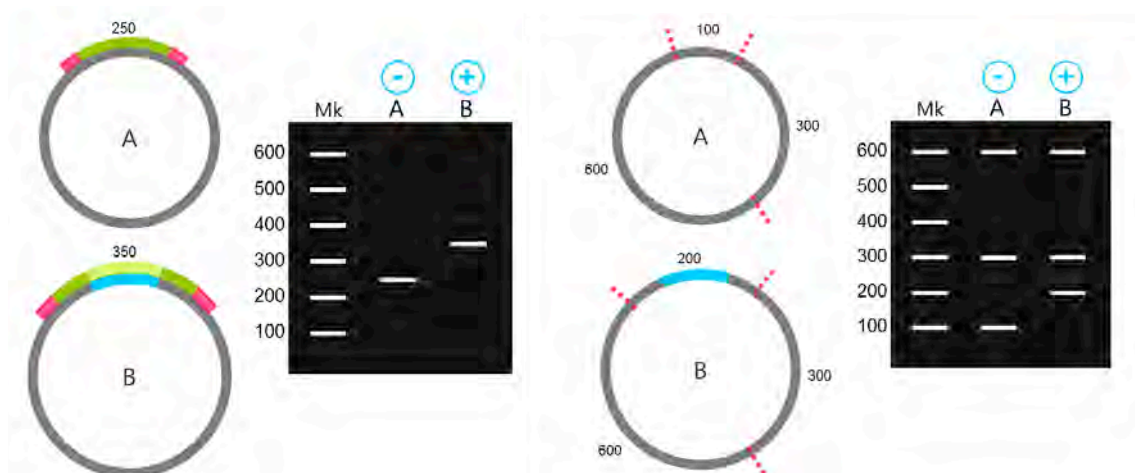
precultivos se realiza la extracción del DNA plasmídico empleando un *kit* de purificación de DNA (*QIAprep Spin Miniprep Kit*, Qiagen) siguiendo las indicaciones del fabricante.

En la **Figura 23** se esquematiza la técnica general de clonado molecular.



**Figura 23. Técnica general de clonado molecular.** Con el producto de ligación entre el plásmido aceptor y el inserto, se transforman bacterias competentes que se siembran en LB agar con el antibiótico correspondiente para realizar así la selección positiva de las bacterias conteniendo plásmidos expresando la resistencia al antibiótico agregado. A partir de las colonias se realiza un precultivo para amplificar los clones, se extrae el ADN de una alícuota de cada precultivo y se verifica la correcta incorporación del inserto en el plásmido aceptor.

Se realiza la verificación de los plásmidos por digestión con enzimas de restricción específicas o por PCR (esquematizadas en la **Figura 24**), tal que permita distinguir entre los plásmidos de interés y los plásmidos aceptores vacíos y, de ser posible, que evidencie la orientación del inserto. Luego de la digestión o de la PCR, se realiza una migración en gel de agarosa del porcentaje adecuado que permita separar los fragmentos de interés, y se observa el patrón de bandas utilizando un transiluminador. Según el patrón obtenido se verifica si el obtenido es el plásmido de interés.



**Figura 24. Verificación.** Para verificar si se ha obtenido el plásmido de interés conteniendo el inserto, se realiza la verificación por digestión con enzimas de restricción específicas y/o por PCR. En la digestión por digestión **(A)** el patrón de fragmentos obtenido en un gel de agarosa luego de la digestión del plásmido permite deducir si el inserto está presente, y puede incluso revelar la orientación del inserto si se realizan digestiones apropiadas. En la verificación por PCR **(B)**, generalmente se obtiene un fragmento que es de mayor tamaño si el inserto está presente.

Una vez identificado un clon de bacteria positivo para la verificación, se amplifica el cultivo a partir del precultivo correspondiente para obtener un mayor volumen de cultivo que permita obtener una cantidad considerable de plásmido. El ADN plasmídico se extrae utilizando un *kit* comercial (*Qiagen Plasmid Midi/Maxi Kit*, Qiagen) siguiendo las indicaciones del fabricante. Se realiza una nueva verificación por digestión o por PCR del ADN obtenido. Siempre que sea posible, una vez amplificado y confirmado el clon de interés por nuevas digestiones y/o PCR, se verifica la secuencia nucleotídica por secuenciación (a cargo de empresa especializada, Eurogentec). En la **Figura 25** se esquematizan los pasos de amplificación y verificación una vez seleccionado el clon positivo.



**Figura 25. Amplificación y verificación.** Una vez identificado el clon de interés, se realiza la amplificación del cultivo, se extrae el ADN y se verifica por digestión con enzimas de restricción o por PCR.



## PCR

Los *primers* o cebadores se resuspenden en agua hasta una concentración final de 100  $\mu$ M para el *stock*, y luego se diluyen a 10  $\mu$ M para su uso en la PCR. Se prepara la mezcla de reacción según las indicaciones del fabricante y se incuba en un termociclador, siguiendo el programa adecuado para cada caso. ADN polimerasas utilizadas: *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* y *Taq DNA Polymerase* (New England Biolabs).

## Hibridación de oligonucleótidos

Se incuba la mezcla de hibridación (conteniendo 2,5  $\mu$ l de cada oligonucleótido trifosfatado, 5  $\mu$ l de *buffer* N<sup>o</sup>2 y 40  $\mu$ l de agua), en un ciclador térmico (modelo PTC-100, MJ Research) y se ejecuta el programa de hibridación (4 min a 95 °C, 10 min a 70 °C, curva de bajada de 0,1°C/30 seg hasta alcanzar los 10°C, 30 min a 4°C).

## LÍNEAS CELULARES

Se utilizaron las siguientes líneas celulares:

**Vero:** línea celular de riñón de mono verde africano (ATCC CCL 81) (Yasumura y Kawakita, 1963).

**7b:** línea celular derivada de células Vero, que expresa las proteínas virales ICP4 e ICP27, esenciales para la replicación del HSV-1 (Krisky y col., 1998; Marconi y col., 1996).

**Gli36:** línea celular derivada de un glioblastoma humano, gentilmente cedidas por el Dr. D. Louis, Harvard, MA, Estados Unidos (Kashima y col., 1995).

**TE-CRE GRINA129:** línea celular derivada de células TE-CRE30 (derivadas de rhabdomyosarcoma humano), que expresan la proteína ICP4 y la recombinasa Cre (Zaupa y col., 2003).

**HEK-293:** línea celular derivada de riñón de embrión humano (Graham y col., 1977).

**B104:** línea celular derivada de neuroblastoma de rata (Schubert y col., 1974).

## Mantenimiento de las líneas celulares

Las células Vero, 7b, Gli36, TE-CRE GRINA129 y HEK-293 se propagan en medio mínimo esencial de Dulbecco (*Dulbecco's minimun essential medium*, DMEM) (Invitrogen), suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (SFBi) (Natocor) y 1% de antibióticos (penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml, Invitrogen). Las células B104 requieren además el agregado de piruvato 1 mM. Se realizan pasajes 1/10, dos veces por semana. Todas las líneas celulares se mantienen a 37 °C en un incubador en una atmósfera humidificada conteniendo 5% de CO<sub>2</sub>.

## TRANSFECCIÓN DE CULTIVOS

Para la transfección de cultivos se utilizan los *kits* comerciales jetPrime (Polyplus) y Lipofectamina 2000 o LTX (Invitrogen), según disponibilidad y conveniencia, teniendo en cuenta que para la transfección conjunta de GluN1 y una subunidad regulatoria del RNMDA, se debe adicionar el medio con Ketamina 500 µM desde el inicio de la transfección.

jetPrime (Polyplus): la transfección no-lipídica se realiza mediante la formación de un complejo jetPRIME-ADN, que ingresa la célula por endocitosis y que escapa del endosoma mediante un mecanismo de tipo "esponja de protones". Se siguen las indicaciones del fabricante. Para transfectar células en placas de 24 pocillos, se preparan diluciones de los plásmidos -conteniendo 0.5 µg de ADN en 50 µl de *buffer* jetPrime-, luego se agrega 1 µl del reactivo jetPrime y se incuba por 10 min a TA. Se agregan los complejos a las células y se incuba durante 4 h en un incubador humidificado a 37 °C con atmósfera conteniendo 5% de CO<sub>2</sub>, luego se reemplaza el medio por medio fresco y se regresa el cultivo al incubador.

Lipofectamina 2000 o LTX (Invitrogen): la transfección se basa en la formación de complejos entre el ADN y lípidos catiónicos. Para transfectar células con Lipofectamina 2000 se siguen las indicaciones del fabricante con algunas modificaciones. Para placas de 24 pocillos, se preparan diluciones de los plásmidos -0.8 µg de ADN en 50 µl de Opti-Mem-, y diluciones de Lipofectamina 2000 en 50 µl de Opti-Mem. Se agrega la dilución del agente transfectante de a gotas en el tubo con la dilución de ADN y se incuba por 5 min a temperatura ambiente. La preparación de los complejos con Lipofectamina LTX se realiza siguiendo las instrucciones del fabricante. En ambos casos, se agrega los complejos de a gotas a los cultivos y se incuba como mínimo 2 h en un incubador humidificado a 37 °C con atmósfera conteniendo 5% de CO<sub>2</sub>, y

luego se reemplaza el medio con los complejos por medio fresco. Los cultivos se incuban en un incubador humidificado a 37 °C con atmósfera conteniendo 5% de CO<sub>2</sub>.

## PRODUCCIÓN DE VECTORES AMPLICON

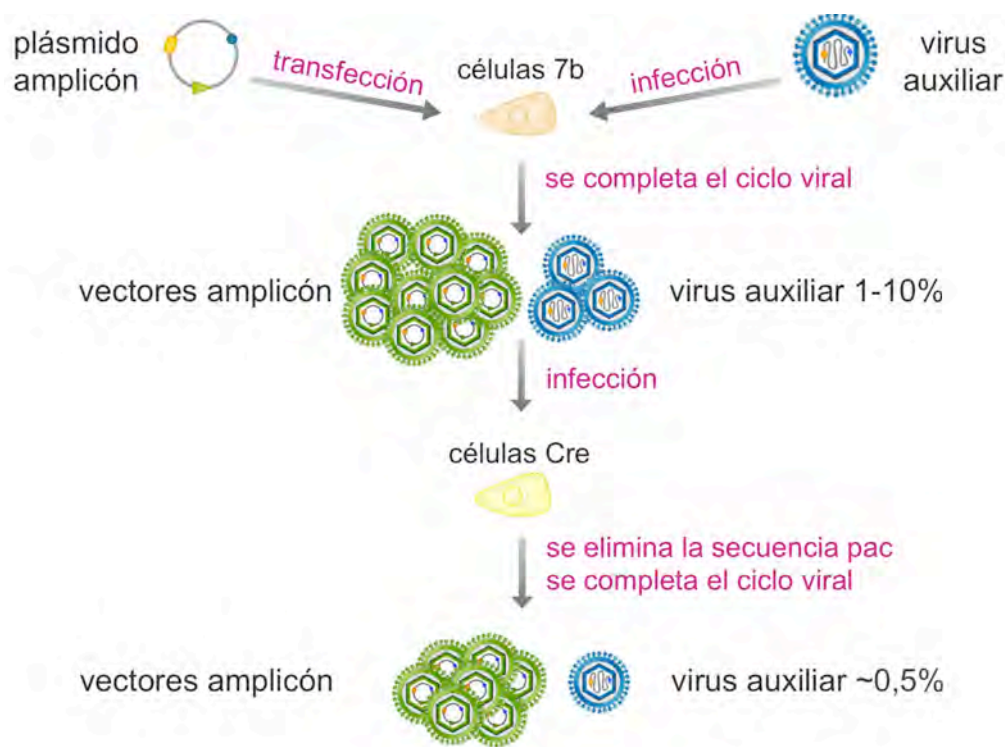
Las producciones de vectores amplicón se preparan de acuerdo a Zaupa y col. (2003), con ligeras modificaciones.

**TRANSFECCIÓN:** se transfecta el plásmido amplicón en células 7b utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen), siguiendo las indicaciones del fabricante.

**INFECCIÓN:** 24 h post-transfección, el cultivo previamente trasfectado se infecta con el virus auxiliar HSV-1 La $\Delta$ J. Se prepara el inóculo en un volumen mínimo de medio 199 suplementado con 1% SFBi y P/S (5 ml para una botella de 75 cm<sup>2</sup>), agregando virus auxiliar para alcanzar una multiplicidad de infección (MOI) de 0,5 virus auxiliares/célula. Se realiza un lavado con medio 199, se agrega el inóculo y se incuba durante 15 minutos en agitador y luego por 90 min a 37 °C en incubadora con 5% de CO<sub>2</sub>. Se descarta el inóculo, se realizan dos lavados con medio 199 y se agrega medio 199 suplementado con 1% SFBi y P/S. Se incuba a 37 °C en incubadora con 5% de CO<sub>2</sub>.

**COSECHA:** entre las 48 y 72 h post-infección se observa bajo microscopio el efecto citopático, que debe ser máximo (células redondeadas y refringentes, que comienzan a desprenderse de la superficie de la botella) para proceder con la cosecha. Se colecta la producción en un tubo, se centrifuga por 10 min a 770 g a 4 °C, se separa en sobrenadante (SN) en un nuevo tubo (SN de cosecha). El *pellet* se resuspende en PBS, y luego se somete a 3 ciclos de congelación en nitrógeno líquido y descongelación a 37 °C para lisar las células y liberar los vectores. Se centrifuga por 10 min a 770 g a 4 °C para eliminar los restos celulares, y se separa el SN (SN1) conteniendo vectores en un nuevo tubo que se mantiene en hielo. Se centrifuga el SN de cosecha a 18000 g a 4 °C por 90 min. Se descarta el SN y se resuspende el *pellet* en un volumen mínimo de PBS, que se suma al SN1, conformando así la producción de vectores, que se reparte en alícuotas y se conserva a -80 °C.

**AMPLIFICACIÓN:** se puede amplificar la producción infectando células 7b con la producción obtenida, siguiendo los pasos de infección y cosecha mencionados previamente, con las siguientes diferencias: se emplea una MOI de al menos 1 amplicón/célula y, de ser posible, una MOI de 0.3 virus auxiliares/célula.



**Figura 26. Producción de vectores amplicón.** Las producciones de vectores amplicón se preparan de acuerdo a Zaupa y col. (2003) con ligeras modificaciones. Se transfecta el plásmido amplicón en una línea celular que transcomplemente las funciones ausentes en el virus auxiliar. 24 hs después se infecta con el virus auxiliar LaLDJ. Cuando el efecto citopático es máximo se cosecha la producción. Se puede realizar un segundo paso de purificación infectando células que transcomplementen las funciones ausentes en el virus auxiliar, y que también expresen la recombinasa Cre. En estas células se elimina la secuencia pac, flanqueada por secuencias LoxP, por recombinación sitio-específica por la recombinasa Cre. De esta manera, el genoma del virus auxiliar no puede empaquetarse, no forma nuevas partículas virales y así disminuye la proporción de virus auxiliar con respecto a los vectores amplicón, obteniéndose producciones más puras.

**PURIFICACIÓN:** cuando se alcanza un título (cantidad de partículas virales) alto y una contaminación (relación virus auxiliar/vector amplicón) moderada -no mayor a 30%-, se puede realizar una etapa de purificación siguiendo los pasos de infección y cosecha mencionados anteriormente, pero infectando células TE-CRE GRINA129 (en lugar de 7b) a una MOI de 0.5 amplicón/célula.

Las células 7b transfectadas incorporan un plásmido amplicón, conteniendo la secuencia de empaquetado, el origen de replicación para el HSV-1, un gen reportero y el transgén de interés. Las proteínas virales requeridas para la replicación y empaquetado del plásmido amplicón son aportadas por el virus auxiliar, con excepción de la ICP4. Sin esta proteína no puede completarse el ciclo viral, por lo tanto el virus auxiliar es defectivo para la replicación. En las células 7b, la proteína ICP4 transcomplementa al virus auxiliar defectivo,

que entonces puede completar su ciclo lítico. Se genera así una población mixta de vectores amplicón y virus auxiliares.

Para obtener una producción enriquecida en vectores amplicón, se infectan células que expresan ICP4 y la recombinasa Cre (células TE-CRE GRINA129) con la producción mixta de vectores amplicón y virus auxiliar. En estas células, Cre induce la recombinación específica entre los sitios loxP que flanquean la secuencia pac en el genoma auxiliar, eliminando dicha secuencia del genoma y evitando así que se formen nuevas partículas conteniendo el genoma del virus auxiliar. De esta manera, se obtiene una producción enriquecida en vectores amplicón y escasamente contaminada con el virus auxiliar.

Es necesario resaltar la importancia de trabajar con producciones de vectores amplicón que presenten baja contaminación con virus auxiliar, ya que los efectos producidos por la expresión de los genes virales -presentes en el genoma del virus auxiliar- podrían dificultar la interpretación de los resultados. También es deseable la obtención de producciones con alto título de vectores amplicón ya que, en muchos casos, existe una limitación para el volumen de inóculo, como ocurre cuando se desea inocular vectores amplicón *in vivo* intra-cerebro (ver sección Cirugías estereotáxicas, página 101).

## **TITULACIÓN DE PRODUCCIONES DE VECTORES AMPLICÓN**

Se infectan monocapas de células Gli36, 7b y Vero en placas de 12 pocillos, con diluciones seriadas de la producción. Se descarta el medio de las células, se realiza un lavado con PBS y se agrega 200 µl de medio 199 (Gibco) suplementado con 1% SFBi (Natocor) y 1% de antibióticos (Invitrogen). Se infecta cada pocillo con un inóculo de 100 µl de dilución de producción, realizando duplicados. Se incuba por 15 min en agitación suave y luego por 90 min a 37 °C en incubadora de CO<sub>2</sub>. Luego se descarta el inóculo por aspiración con bomba y se agrega 800 µl medio. Para las células Gli36 se utiliza medio 199 suplementado con 1% SFBi y 1% de antibióticos; para las células Vero y 7b se utiliza el mismo medio adicionado previamente con 1% de carboxi-metil-celulosa (Gibco) para obtener un medio con mayor densidad. Los cultivos se mantienen en un incubador humidificado a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>.

A las 24 h post-infección se evalúa en las células Gli36 la cantidad de células que expresan la proteína reportera. Se descarta el medio por aspiración con bomba para obtener un campo más definido. Por observación bajo microscopio de fluorescencia se determina el

título de vectores amplicón, que se expresa como Unidades Transductoras por ml (UT/ml).

A las 72 h post-infección se evalúa en las células 7b la cantidad de Unidades Formadoras de Placa (UFP). Las células 7b transcomplementan al virus auxiliar (expresan la ICP4, ausente en el genoma del virus auxiliar LaLDJ) permitiendo que el virus complete su ciclo lítico. Los virus liberados infectan a las células adyacentes, de manera restringida gracias a la alta densidad del medio. Se forman así las UFP, que se observan como agujeros en la monocapa celular. Por observación bajo microscopio se determina el título de virus auxiliar, que se expresa como UFP/ml.

A las 72 h post-infección se evalúa en las células Vero la presencia de UFP. Las células Vero no expresan la proteína ICP4, y por lo tanto el virus auxiliar -defectivo para la replicación, ya que carece del gen que expresa la ICP4- no puede completar su ciclo lítico. De observarse tan sólo una UFP, esto indicaría la presencia de revertantes, motivo por el cual debería descartarse el *stock* y reiniciarse el proceso de producción desde el comienzo.

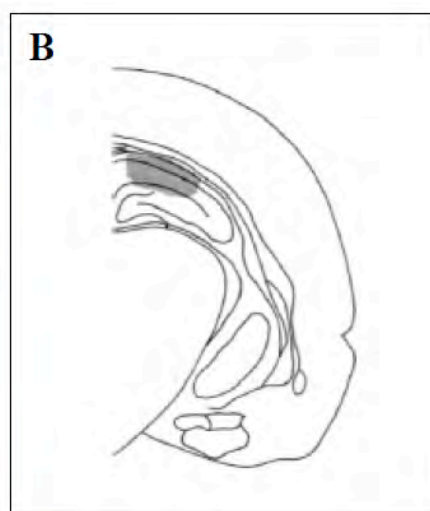
## INFECCIÓN DE CULTIVOS

La cantidad de vector utilizado para la infección se calcula a partir del número de células a infectar, el título de los vectores obtenido en la fase de titulación y la MOI deseada. El título de los vectores representa la cantidad de vectores presentes por ml de solución de *stock*. La MOI refleja el número de vectores por célula. A mayor MOI, mayor cantidad de vectores por célula. En los experimentos presentados en esta Tesis se utilizó una MOI de 3 vectores/célula.

Para la infección de cultivos primarios en placas de 24 pocillos, se prepara el inóculo con un volumen final de 100 µl por pocillo. El volumen de vector correspondiente a la MOI deseada se diluye en medio NB condicionado. Se retira parte del medio de cultivo, dejando las células aproximadamente en 300 µl de medio y se agrega el inóculo. Se incuba por 15 min a TA en agitación suave y luego se incuba por 90 min a 37 °C en incubador humidificado con atmósfera conteniendo 5% de CO<sub>2</sub>. Una vez finalizada la incubación, se retira el inóculo por aspiración y se agrega 500 µl de una mezcla de NB condicionado y NB fresco. La expresión de los transgenes se evalúa generalmente a las 48 h post-infección.

## CIRUGÍAS ESTEREOTÁXICAS

La inoculación intra-hipocampal de vectores se realiza mediante cirugía estereotáxica en condiciones de anestesia general. Las ratas se anestesian con un volumen de 0.2 ml/100 g administrado por vía intraperitoneal (IP), de una solución de Ketamina:Xilacina en proporción de 3:0.8 (75:10 mg/kg), con anestésicos de uso veterinario conteniendo Ketamina al 50% (Ketonal® o Ketamina®) y Xilacina al 2% (Rompun® o Kensol®). Para la cirugía e inyección de los vectores se utiliza un aparato estereotáxico para pequeños animales (David Kopf). La técnica quirúrgica consiste en realizar una incisión longitudinal en la piel que recubre el dorso del cráneo, en la línea media interaural, separando luego la piel y divulcionando la fina musculatura; se legra luego suavemente la superficie del cráneo con instrumental romo para retirar el periostio. Luego se realiza la craneotomía bilateral con torno de odontología, para inocular bilateralmente la suspensión de vectores empleando un sistema de inyección que consiste en: una jeringa Hamilton -que permite inyectar volúmenes en el orden de los microlitros-, un tubo de silicona y una aguja hipodérmica descartable de acero inoxidable de calibre 27 G, a la cual se le retira el soporte para poder sujetarla al mástil del marco estereotáxico. La ubicación de las inyecciones se determina según las coordenadas indicadas en el Atlas de Paxinos y Watson (Paxinos y Watson, 1986) a partir del punto de intersección



**Figura 27. Cirugía y región de inyección. A)** Aparato de esterotaxia con animal fijado para la cirugía e inyección de vectores amplicón. **B)** Sección del cerebro de rata en el plano AP -4.3 del atlas Paxinos y Watson (1996). El área sombreada indica aproximadamente la extensión de la zona abarcada por la inyección de la región CA1 del hipocampo dorsal.

entre las suturas de los huesos frontal y parietales, conocido como “Bregma”. Para la inyección en hipocampo dorsal las coordenadas a partir de Bregma son: AP: -4.3 mm; LL:  $\pm 4.0$  mm; DV: -2.3 mm. Se inyecta 1  $\mu$ l de suspensión de vectores lentamente -durante 2 min-, se espera 4 min y luego se retira la aguja. Se cierra la incisión en la piel utilizando pegamento acrílico y se aplica un polvo cicatrizante (Farm-X). Al finalizar la cirugía se administra una dosis intramuscular de 5 mg/kg del antibiótico Enrofloxacin al 5%. Se espera 5 días luego de la cirugía para permitir la recuperación de los animales y la expresión de los transgenes codificados por los vectores, y entonces se realizan los ensayos comportamentales.

## EVITACIÓN INHIBITORIA

El aprendizaje aversivo constituye uno de los paradigmas más utilizados en ensayos de memoria y aprendizaje. En la prueba de evitación inhibitoria se esgrime la idea de que al llevar a una rata a un ambiente novedoso, el animal experimenta una fuerte tendencia a explorar, con preferencia hacia los lugares oscuros. Por ello, cuando el animal es depositado en el compartimiento iluminado, al abrirse la compuerta que permite el paso hacia el compartimiento oscuro, el animal ingresa a este compartimiento y, cuando lo hace, recibe una leve descarga eléctrica que actúa como estímulo desagradable (aversivo). Si aprendió y si se formó una memoria, la re-exposición del animal al mismo entorno permitirá evocar el recuerdo de aquella situación; el animal relacionará el estímulo desagradable con el contexto de la jaula y el paso al compartimiento oscuro. Aquí se asocia la memoria espacial con la aversiva. El hecho de no traspasar la compuerta hacia el compartimiento oscuro y permanecer en el compartimiento iluminado le permitirá evitar la descarga eléctrica desagradable. Por lo tanto, el aumento del tiempo de permanencia en el compartimiento iluminado constituye un indicador del aprendizaje y la retención de esa memoria. Como todo aprendizaje aversivo, esta prueba involucra y requiere integridad de ciertas estructuras como el hipocampo y la amígdala.

Cada rata se deposita en el compartimiento iluminado, dentro de una caja acrílica (40.0 cm de alto x 30.0 cm de ancho x 60.0 cm de largo), cuyo piso consiste en una grilla electrificable de barras paralelas de bronce de 3.0 mm de diámetro, con una separación entre barras de 5.0 mm (**Figura 28**) (Coletti, 2011). Se considera latencia al tiempo al tiempo que los animales demoran en pasar de un compartimiento iluminado a un compartimiento oscuro con sus cuatro patas. En la sesión de entrenamiento, los animales reciben una descarga eléctrica suave de 0.5 mA durante sólo 2 seg, inmediatamente después de ingresar al compartimiento



oscuro. Luego, los animales son retirados y regresados a sus jaulas. La retención es evaluada en una sesión de test 24 h después del entrenamiento, volviendo a colocar a los animales en el compartimiento iluminado y midiendo la latencia en pasar al compartimiento oscuro (evocación). En la sesión de test los animales no reciben descarga eléctrica. El desempeño se evalúa por comparación estadística entre las latencias de las sesiones de entrenamiento y de test. Una latencia aumentada en la sesión de test, respecto a la sesión de entrenamiento, refleja que la tarea fue aprendida y es recordada.

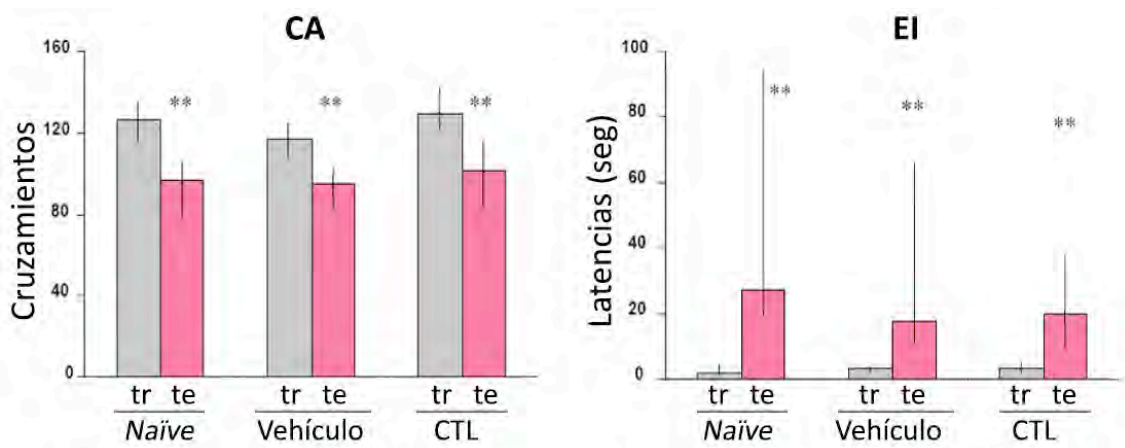


**Figura 28. Caja de evitación inhibitoria en su versión *step-through*.** La caja cuenta con un compartimiento iluminado y otro oscuro que se encuentran separados por una compuerta, y una grilla electrificable como piso.

## **CONTROL DE LOS POSIBLES EFECTOS DE LA CIRUGÍA, DE LA INYECCIÓN ESTEREOTÁXICA Y DE LOS VECTORES**

Con el objetivo de estudiar los posibles efectos de la cirugía, la inyección estereotáxica y los vectores, se estudiaron 3 grupos de animales: inoculados en hipocampo dorsal con el vector control (CTL) A-GFP (Cheli y col., 2002) o con vehículo, y no inoculados (*naïve*). 5 días post-inoculación se evaluó el desempeño de los animales en la tarea de CA en dos sesiones separadas por 24 h y, por otro lado, se evaluó el desempeño de otro grupo de animales en la tarea de EI en una sesión de entrenamiento y otra de prueba realizada 24 h más tarde.

Como se muestra en la **Figura 29**, en la tarea de CA todos los grupos evidenciaron disminución significativa del número de cruzamientos en la segunda sesión de CA con



**Figura 29. Control de cirugía e inyección.** Se estudió el desempeño en las tareas de campo abierto (CA) y evitación inhibitoria (EI) de 3 grupos de animales (*Naïve* e inyectados intra-hipocampalmente con vehículo o con un vector CTL) 5 días después de la cirugía. Se evaluaron los cruzamientos (CA) y las latencias de descenso de la plataforma (EI) en una sesión de entrenamiento (tr, barras grises) y, 24 h después, en una sesión de prueba (te, barras rosas). Se grafican las medianas de los cruzamientos (CA) y de las latencias (EI) con sus intervalos intercuartiles. Comparación entre sesiones dentro de un mismo grupo por prueba de Wilcoxon. Comparación entre grupos por ANOVA de Kruskal Wallis. \*\*  $p < 0.05$ . *Naïve*, N = 10; Vehículo, N = 10; CTL, N = 11.

respecto a la primera sesión (**Figura 29**, izquierda), verificando la formación de MLP de habituación. En la tarea de EI -en su modalidad *step-down*-, todos los grupos evidenciaron aumento significativo de la latencia de descenso el día de la prueba comparado con el día del entrenamiento (**Figura 29**, derecha), verificando la formación de MLP. No se observaron diferencias significativas entre grupos en la sesión de entrenamiento de cada una de las tareas.

La cirugía, la inyección del vehículo y la inoculación de los vectores amplicón no evidenciaron tener efectos *per se* sobre el comportamiento de los animales, por lo que los controles *naïve* e inyectados con vehículo no se incluyeron en ensayos comportamentales posteriores, tomándose como grupo control animales inoculados con un vector CTL (A-GFP o A-GFP-LacZ) (Adrover y col., 2003; Adrover, 2006).

# RESULTADOS

---



## DESARROLLO DE VECTORES AMPLICÓN PARA MODIFICAR LA EXPRESIÓN DE LAS SUBUNIDADES GLUN2A Y GLUN2B

Los vectores virales de tipo amplicón son herramientas para la transferencia de transgenes al SNC. Estos vectores presentan mínima toxicidad, poseen una gran capacidad para albergar transgenes (hasta 150 kpb), son capaces de infectar una amplia variedad de tipos celulares, incluyendo neuronas y células epiteliales, y no presentan riesgo de producir mutagenesis insercional, ya que el genoma viral no se inserta en el genoma de la célula infectada.

Para estudiar el rol de los diferentes subtipos de RNMDA en la formación de memorias, nos propusimos desarrollar vectores amplicón como herramientas para modificar selectivamente la expresión de las subunidades del RNMDA, centrando nuestra atención en las subunidades regulatorias predominantes en hipocampo: GluN2A y GluN2B.

Por otro lado, nos propusimos desarrollar vectores amplicón capaces de expresar un anticuerpo monocatenario (scFv) específico contra  $\alpha\beta$ A, como una posible herramienta terapéutica experimental para atenuar los efectos deletéreos de los  $\alpha\beta$ A *in vivo*.

En el desarrollo de vectores amplicón, el primer paso consiste en construir los plásmidos amplicón que posteriormente conformarán el genoma de los vectores. En base a los objetivos planteados, construimos los siguientes plásmidos:

**pA<sub>2</sub>-2A(S) y pA<sub>2</sub>-2B(S):** plásmidos amplicón conteniendo secuencias que codifican en orientación sentido (S) las subunidades GluN2A y GluN2B, respectivamente, para expresar/sobre-expresar dichas subunidades.

**pA<sub>2</sub>-2A(AS) y pA<sub>2</sub>-2B(AS):** plásmidos amplicón conteniendo secuencias que codifican en orientación antisentido (AS) las subunidades GluN2A y GluN2B, respectivamente, para expresar ARN AS contra las subunidades, con el fin de disminuir la expresión de dichas subunidades.

**pA<sub>2</sub>-SP-NUsc1(X59E):** plásmido amplicón conteniendo una secuencia que codifica un scFv anti- $\alpha\beta$ A. La construcción de este plásmido se detalla en el Anexo “Desarrollo de vectores amplicón para expresar un scFv específico contra  $\alpha\beta$ A” (página 135).

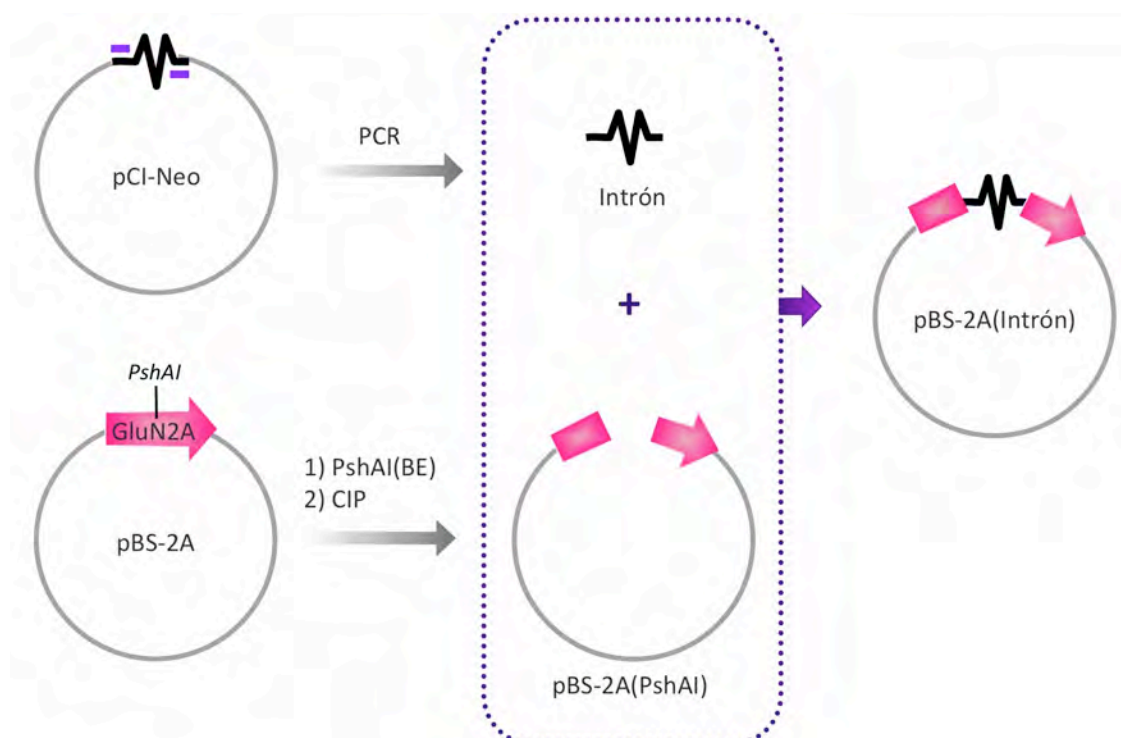
## CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS AMPLICÓN PARA MODIFICAR LA EXPRESIÓN DE LAS SUBUNIDADES GLUN2A Y GLUN2B

Inicialmente, intentamos construir plásmidos amplicón codificando la subunidades GluN2A y GluN2B, obteniendo dichas secuencias a partir de plásmidos conteniendo el marco abierto de lectura (ORF, del inglés *Open Reading Frame*) de las mencionadas subunidades, para insertarlos en el plásmido amplicón pA<sub>2</sub> [también llamado pA-EUA<sub>2</sub> o pA-(GFP) (Cuchet y col., 2005)] bajo control del promotor hCMV. Aunque pudimos obtener los fragmentos esperados, incubamos los fragmentos con la ligasa y, con el producto de ligación, transformamos bacterias *E. coli* altamente competentes (ver Materiales y Métodos, sección Estrategia general de clonado, página 91), luego de la selección negativa en agar LB con ampicilina y la verificación por digestión, no logramos obtener clones conteniendo el inserto (resultados no mostrados). Estos resultados podrían explicarse teniendo en cuenta que se ha reportado que algunos promotores virales (entre ellos el promotor hCMV) son capaces de iniciar la expresión de secuencias presentes río abajo en bacterias (Goussard y col., 2003; Lewin y col., 2005). La expresión de las subunidades podría resultar tóxica para las bacterias.

Planteamos entonces la construcción de plásmidos amplicón conteniendo los ORF de las subunidades GluN2A y GluN2B, pero en este caso interrumpidas por un intrón, con el objetivo de evitar la expresión de las subunidades en bacterias. Con este objetivo, planteamos estrategias de clonado de dos pasos: 1) construcción de plásmidos intermediarios que contengan el ORF de cada subunidad interrumpido por un intrón; 2) introducción de cada ORF –interrumpido por un intrón– en orientación S o AS, bajo control del promotor hCMV en el plásmido amplicón pA<sub>2</sub>.

### Plásmidos amplicón para modificar la expresión de la subunidad GluN2A

En la **Figura 30** se esquematiza el primer paso de la estrategia de clonado para obtener los plásmidos pA<sub>2</sub>-2A(S) y pA<sub>2</sub>-2A(AS): construcción del plásmido intermediario pBS-2A(Intrón) por introducción en el sitio PshAI del plásmido pBS-2A de un fragmento de 133 pb conteniendo un Intrón (obtenido por PCR a partir del plásmido pCI-Neo (Promega)).



**Figura 30. Esquema de la estrategia de clonado para obtener el plásmido intermediario pBS-2A(Intrón).** Introducción de un fragmento de 133 pb (obtenido por PCR) conteniendo el Intrón del plásmido pCI-Neo, en el sitio PshAI del plásmido pBS-2A.

En la **Tabla 2** se detalla el programa de termociclado y los primers específicos utilizados para obtener el producto de PCR Intrón a partir del plásmido pCI-Neo.

Programa Intrón	
1) 98°C por 1 min (desnaturalización inicial)	
2) 98°C por 30 seg (desnaturalización)	
3) 60°C por 1 min (hibridación)	
4) 72°C por 1 min (extensión)	
5) Ir a 3) - 35 ciclos	
6) 72°C por 10 min (extensión final)	
7) 10°C mantiene indefinidamente	
Plásmido	pCI-neo
Primer Forward	5' gtaagtatcaaggttacaagacagg 3'
Primer Reverse	5' ctgtggagagaaaggcaaagtggatg 3'
Tamaño del producto	133 pb

**Tabla 2. Programa de PCR y primers específicos para obtener el producto Intrón.** Se detalla el programa de termociclado (programa Intrón), los primers específicos para cada plásmido y el tamaño esperado del producto de PCR.

Como se observa en la **Figura 30**, por PCR a partir del plásmido pCI-Neo obtuvimos un fragmento Intrón de 133 pb (ver detalles en **Tabla 2**). El plásmido pBS-2A (plásmido Bluescript conteniendo el ORF de la subunidad GluN2A) se linearizó con la enzima PshAI, generando extremos romos (BE, del inglés *blunt-end*), y luego se incubó con la fosfatasa alcalina (CIP) para defosfatar los extremos, disminuyendo así la probabilidad de que el plásmido aceptor se ligara sin incluir un inserto. Se incubaron los fragmentos Intrón y pBS-2A(PshAI-BE) con la enzima T4 DNA ligasa, y con el producto de esta reacción se transformaron bacterias *E. coli* altamente competentes (NEB-5-alpha). Por selección negativa en agar LB con ampicilina, se obtuvieron colonias bacterianas a partir de las cuales se realizaron precultivos y se extrajo el DNA de cada precultivo

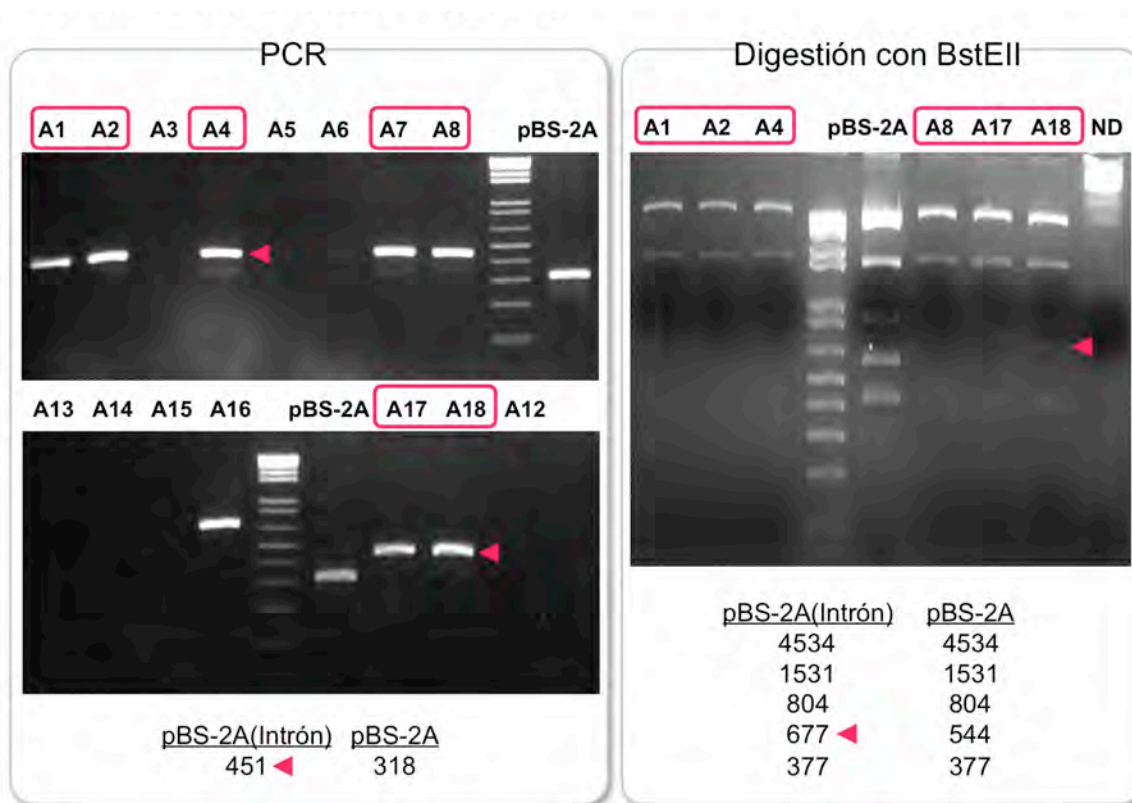
La verificación de los clones se realizó por análisis de los patrones de bandas obtenidas por PCR, por un lado, y por digestión luego de incubación con la enzima de restricción BstEII, por otro. Para realizar el *screening* por PCR, se diseñaron *primers* específicos a aproximadamente 200 pb río arriba y 200 pb río arriba del Intrón, y se corrió el programa (ScrInt) en un termociclador PTC-100 (Bio-Rad). En la **Tabla 3** se detalla el programa de termociclado y los *primers* específicos utilizados para el plásmido pBS-2A(Intrón) y para el plásmido pBS-2B(Intrón) (ver más adelante).

Programa de <i>Screening</i> (ScrInt)		
1) 95°C por 20 min (desnaturalización inicial) 2) 95°C por 30 seg (desnaturalización) 3) 60°C por 1 min (hibridación) 4) 68°C por 1 min (extensión) 5) Ir a 3) - 35 ciclos 6) 68°C por 5 min (extensión final) 7) 10°C mantiene indefinidamente		
Plásmido	pBS-2A(Intrón)	pBS-2B(Intrón)
<i>Primer Forward</i>	5'-gcaagccacagttatgctga-3'	5'-ggcatgaagagggcctaca-3'
<i>Primer Reverse</i>	5'-ctggggacaatccagaagaa-3'	5'-ccagacccagagtaaccaa-3'
Tamaño del producto - con 1 inserto	451 pb	468 pb
Tamaño del producto - sin inserto	318 pb	335 pb

**Tabla 3. *Screening* por PCR de los plásmidos pBS-2A(Intrón) y pBS-2B(Intrón).** Se detalla el programa de termociclado (programa ScrInt), los *primers* específicos para cada plásmido y el tamaño esperado de los productos de PCR según contengan o no la inserción del Intrón.

En la **Figura 31** se muestra la migración en un gel de agarosa 2% de los productos de PCR del *screening* para el plásmido pBS-2A(Intrón), y la migración en un gel de agarosa 1% de los productos de digestión con la enzima BstEII.

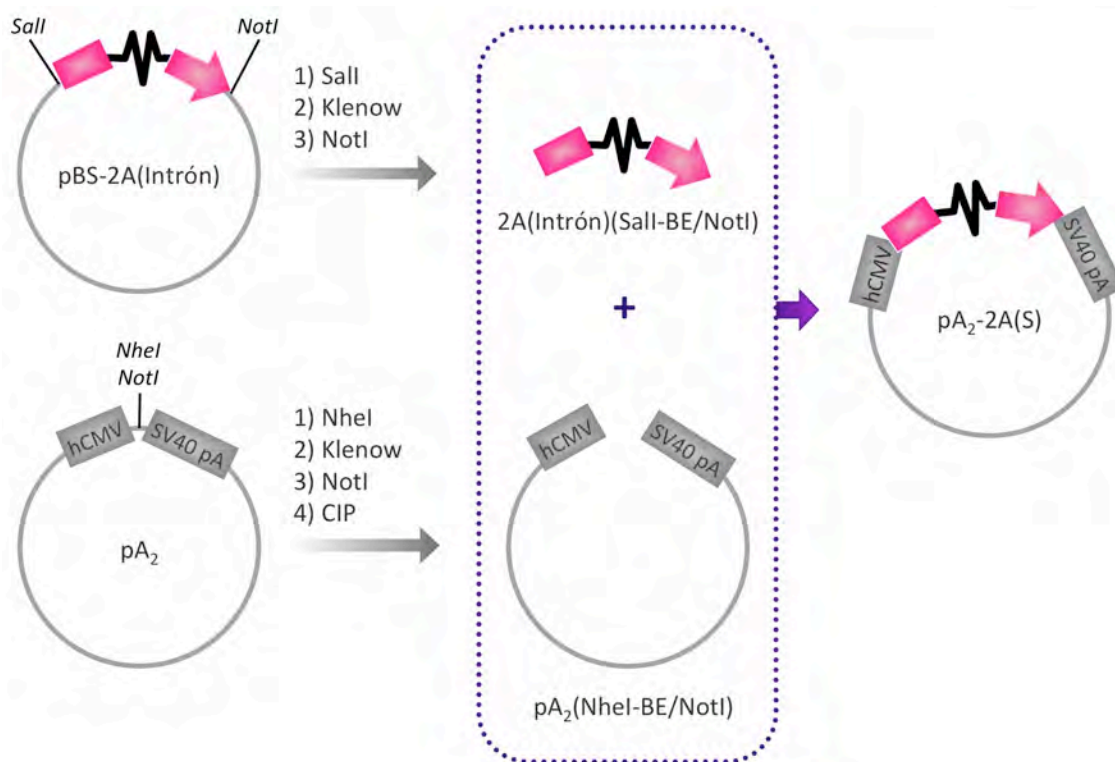




**Figura 31. Migración en gel de agarosa 2% de los fragmentos obtenidos por PCR y por digestión enzimática del plásmido pBS-2A(Intrón) y pBS-2A.** Se analizaron varios clones para pBS-2A(Intrón) por PCR y por digestión con la enzima BstEII. Para la verificación por PCR, se verificó la presencia de una banda de 451 pb, correspondiente al fragmento conteniendo el Intrón (flecha), para los clones A1, A2, A4, A7, A8, A17, A18. Se observa una banda de 318 pb para el control negativo pBS-2A. Para la verificación por digestión, se observó el patrón esperado para todos los clones analizados. La banda que diferencia la presencia del Intrón (677 pb) no se observa en el control negativo pBS-2A.

Como se puede observar en la **Figura 31**, se obtuvieron varios clones positivos para el plásmido pBS-2A(Intrón). Se seleccionó un clon (A8), con el cual se continuaron las estrategias de clonado para obtener el plásmido pA<sub>2</sub>-2A(S) (**Figura 32**) y el plásmido pA<sub>2</sub>-2A(AS) (**Figura 33**).

En la **Figura 32** se esquematiza el segundo paso de la estrategia de clonado para obtener el plásmido pA<sub>2</sub>-2A(S), que constó en la introducción de un fragmento Sall-BE/NotI de 5013 pb (conteniendo la secuencia 2A(Intrón), conteniendo el ORF de la subunidad GluN2A - con un Intrón intercalado- obtenido a partir del plásmido pBS-2A(Intrón), entre los sitios NheI-BE/NotI del plásmido amplicón pA<sub>2</sub>.

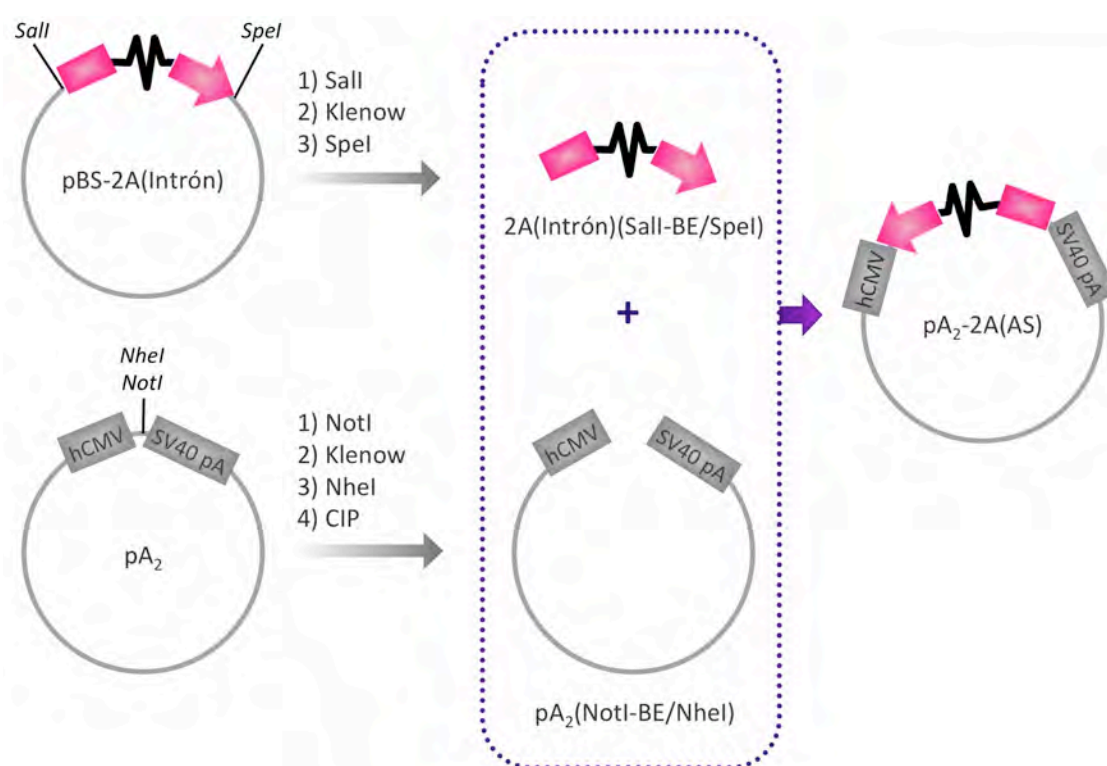


**Figura 32. Estrategia de clonado para el plásmido amplicón pA<sub>2</sub>-2A(S).** Introducción de un fragmento Sall-BE/NotI de 5013 pb conteniendo el ORF de la subunidad GluN2A del RNMDA con intrón intercalado -obtenido a partir del plásmido pBS-2A(Intrón)-, entre los sitios NheI-BE/NotI del plásmido amplicón pA<sub>2</sub>.

Como se muestra en la **Figura 32**, para la obtención del plásmido amplicón pA<sub>2</sub>-2A(S), se digirió el plásmido pA<sub>2</sub> con la enzima NheI, se purificó en columna para eliminar la enzima y el *buffer* utilizado, luego se incubó con el fragmento de Klenow y con dNTPs con el fin de generar extremos romos, y luego se sometió el producto de reacción a migración en un gel de agarosa 0,5 %. Del gel se extrajo la banda correspondiente a 7744 pb y se purificó el DNA utilizando el kit comercial *Nucleospin Extract II*. De esta manera se obtuvo el fragmento pA<sub>2</sub>(NheI-BE), que se digirió con la enzima NotI y luego se incubó con la enzima CIP para defosforilar los extremos. Se obtuvo así el fragmento pA<sub>2</sub>(Nhe-BE/NotI). Utilizando el kit comercial *Nucleospin Extract II* se eliminó la mezcla de reacción y se eluyó el DNA con agua. Finalmente, se cuantificó la cantidad de DNA utilizando un espectrofotómetro de microvolumen (Nanodrop, Thermo Scientific). Por otro lado, se digirió el plásmido pBS-2A(Intrón) con la enzima Sall. Se purificó utilizando el kit comercial *Nucleospin Extract II* y se incubó con el fragmento de Klenow y con dNTPs para generar extremos romos. Se eliminó la enzima y el *buffer* utilizando el kit comercial *Nucleospin Extract II*, se eluyó con agua y se incubó con la enzima de restricción NotI. El producto de la digestión se corrió en un gel de

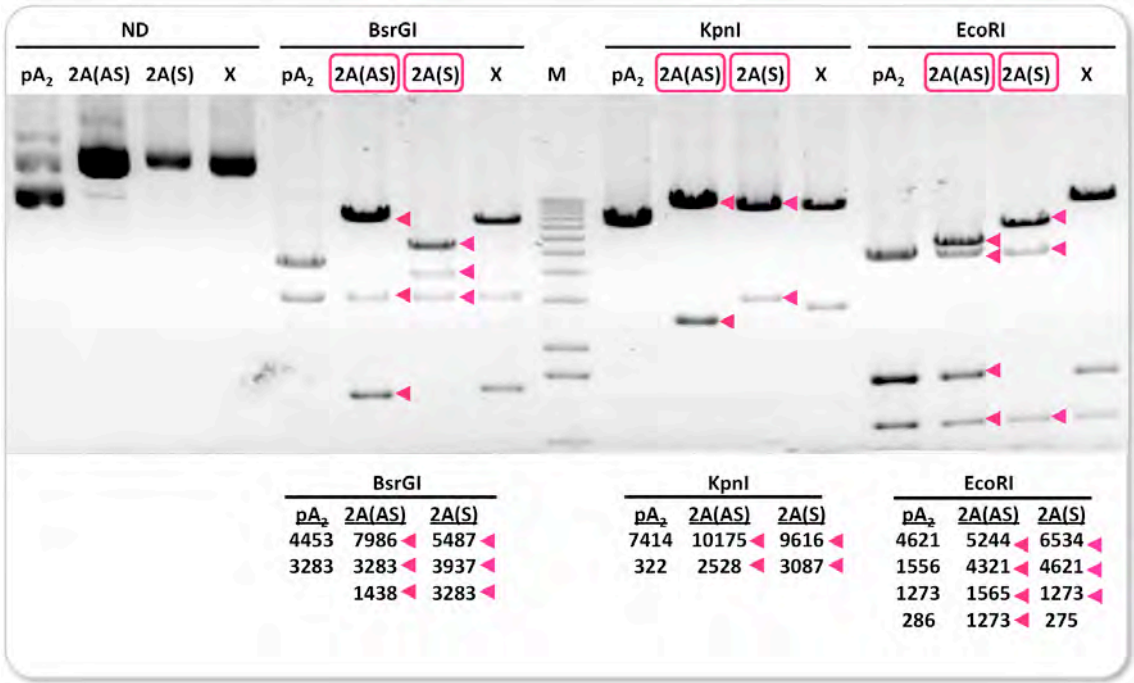
agarosa 0,5 %. Se observó el patrón de bandas esperado (5025 pb + 2898 pb). Se cortó la porción de gel correspondiente a la banda de 5025 pb y se extrajo y purificó el ADN utilizando el *kit* comercial *Nucleospin Extract II*. Se obtuvo así el fragmento 2A(Intrón)(Sall-BE/NotI). La concentración de ADN se determinó utilizando un espectrofotómetro de microvolumen. Finalmente, se ligaron los fragmentos pA<sub>2</sub>(Nhe-BE/NotI) y 2A(Intrón)(Sall-BE/NotI), para obtener el plásmido amplicón pA<sub>2</sub>-2A(S), conteniendo la secuencia 2A(Intrón) en orientación sentido, bajo control del promotor hCMV.

Para obtener el plásmido amplicón pA<sub>2</sub>-2A(AS), conteniendo la secuencia 2A(Intrón) en orientación antisentido bajo control del promotor hCMV, se siguió la estrategia esquematizada en la **Figura 33**. A partir del plásmido pBS-2A(Intrón) se obtuvo un fragmento 2A(Intrón)(Sall-BE/Spel) (compatible con NheI, de 5013 pb) conteniendo una secuencia que codifica la subunidad GluN2A -con intrón intercalado-. Este fragmento se insertó entre los sitios NotI-BE/NheI (compatible con Spel) del plásmido amplicón pA<sub>2</sub>.



**Figura 33. Estrategia de clonado para el plásmido amplicón pA<sub>2</sub>-2A(AS).** Introducción de un fragmento *Sall*-BE/*Spel* (compatible con *NheI*) de 5013 pb conteniendo el ORF de la subunidad GluN2A con un Intrón intercalado -obtenido a partir del plásmido pBS-2A(Intrón)-, entre los sitios *NotI*-BE/*NheI* (compatible con *Spel*) del plásmido amplicón pA<sub>2</sub>.

En la **Figura 34** se muestra la migración en gel de agarosa de los fragmentos obtenidos por digestión enzimática para la verificación de los clones positivos para los plásmidos pA<sub>2</sub>-2A(S) y pA<sub>2</sub>-2A(AS).



**Figura 34. Migración en gel de agarosa de los fragmentos obtenidos por digestión enzimática de los plásmidos pA<sub>2</sub>-2A(S), pA<sub>2</sub>-2A(AS) y pA<sub>2</sub>.** Por digestión con enzimas de restricción se verificaron los clones positivos para el plásmido pA<sub>2</sub>-2A(S) (2A(S), indicado en naranja) y para el plásmido pA<sub>2</sub>-2A(AS) (2A(AS), indicado en rosa). Se verificaron los patrones de bandas esperados para las digestiones con las enzimas BsrGI y KpnI, elegidas ya que permiten discriminar orientación sentido (S) y antisentido (AS) del inserto 2A(Intrón). Por digestión con la enzima EcoRI se confirmó la presencia de una banda a la altura de 1273 pb, correspondiente a la secuencia de corte/empaquetado esencial en todo plásmido amplicón. M, marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Life Technologies). ND: no digerido.

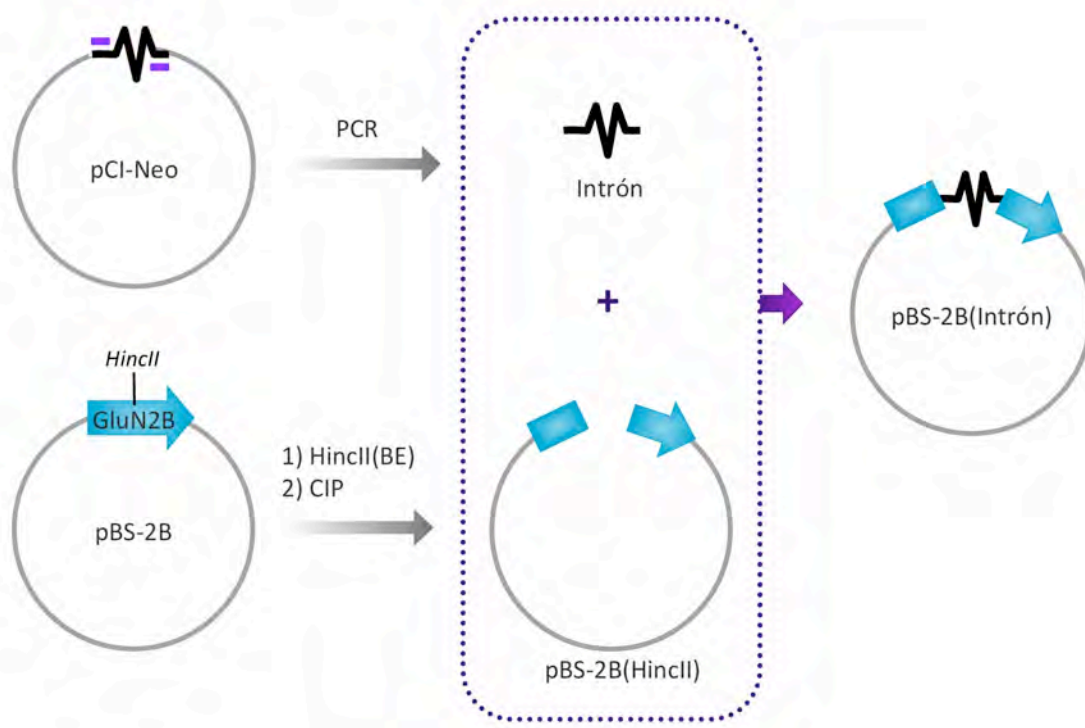
Como se muestra en la **Figura 34**, se verificaron los clones positivos pA<sub>2</sub>-2A(S) y pA<sub>2</sub>-2A(AS) por digestión con enzimas de restricción. Para la verificación de plásmido pA<sub>2</sub>-2A(S), tanto la digestión con la enzima BsrGI como la digestión con la enzima KpnI permitieron discriminar la orientación (sentido y antisentido) del inserto 2A(Intrón) bajo el promotor hCMV dentro del pA<sub>2</sub>. Para el plásmido pA<sub>2</sub>-2A(S) se verificaron los patrones de bandas esperados por digestión con las enzimas BsrGI y KpnI, corroborando la orientación sentido del inserto 2A(Intrón). Para el plásmido pA<sub>2</sub>-2A(S) se verificaron los patrones de bandas esperados por digestión con las enzimas BsrGI y KpnI, corroborando la orientación antisentido del inserto 2A(Intrón). En todo plásmido amplicón es esencial verificar la presencia de la secuencia pac de corte/empaquetado, ya que sin esta secuencia el plásmido no podría ser cortado ni empaquetado para formar partículas virales. La digestión con la enzima EcoRI permite escindir

la secuencia pac del módulo amplicón en una banda que migra a la altura de 1273 pb. Como se muestra en la **Figura 34**, por medio de digestión con EcoRI se verificó la presencia de la secuencia pac en los plásmidos pA<sub>2</sub>-2A(S) y pA<sub>2</sub>-2A(AS). De esta manera, confirmamos la construcción de los plásmidos amplicón pA<sub>2</sub>-2A(S) y pA<sub>2</sub>-2A(AS).

## Plásmidos amplicón para modificar la expresión de la subunidad GluN2B

En el caso de la subunidad GluN2B también se realizó una estrategia de clonado de dos pasos: 1) la construcción de un plásmido intermediario pBS-2B(Intrón), conteniendo una secuencia codificando la subunidad GluN2B con un Intrón intercalado y 2) la introducción de la secuencia codificando la subunidad GluN2B –con un Intrón intercalado- en el plásmido amplicón pA<sub>2</sub>, para obtener finalmente los plásmidos amplicón pA<sub>2</sub>-2B(S) y pA<sub>2</sub>-2B(AS).

En la **Figura 35** se esquematiza la estrategia de clonado para obtener el plásmido intermediario pBS-2B(Intrón).

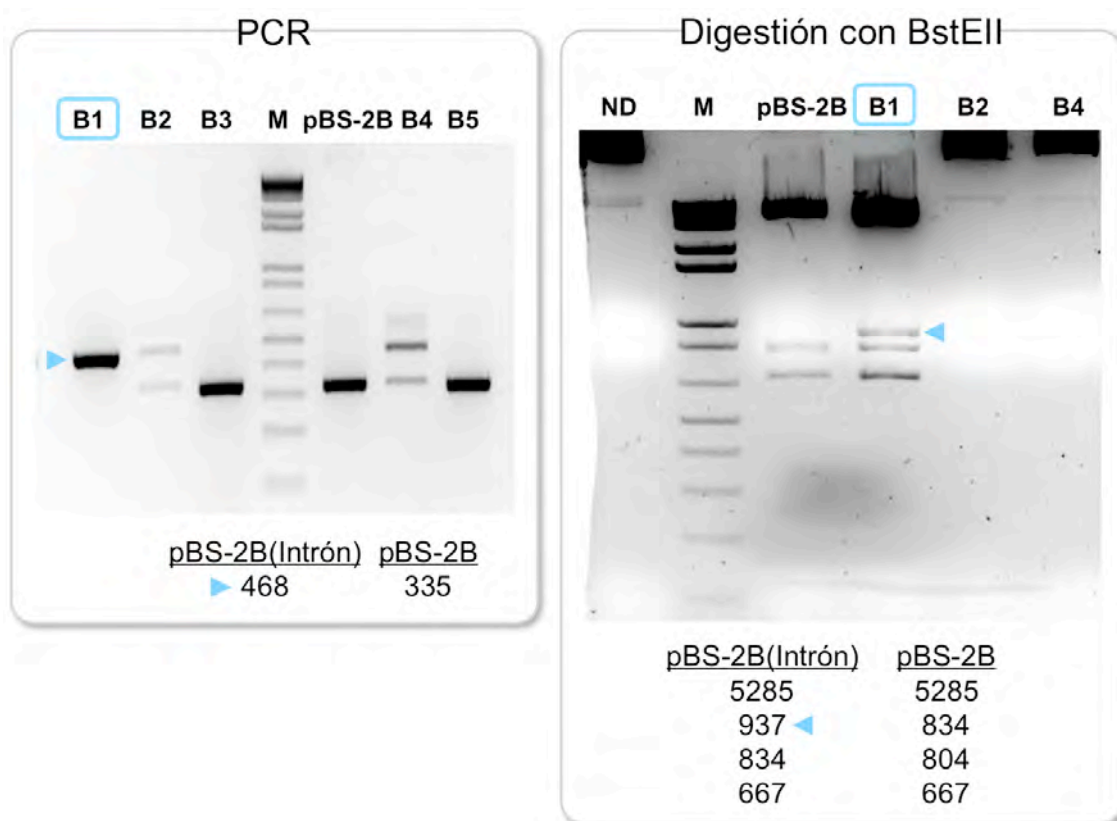


**Figura 35. Estrategia de clonado para el plásmido amplicón pBS-2B(Intrón).** Introducción de un fragmento de 133 pb (obtenido por PCR) conteniendo el intrón del plásmido pCI-Neo, en el sitio HincII(BE) del plásmido pBS-2B.



Como se muestra en la **Figura 35**, a partir del plásmido del pCI.Neo, por PCR se obtuvo un fragmento de 133 pb conteniendo el Intrón, como se detalló anteriormente (ver **Tabla 2**). Por otro lado, con la enzima HincII, que genera extremos romos, se digirió el plásmido pBS-2B, que presenta un único sitio de corte para HincII dentro de la secuencia codificando GluN2B. El fragmento Intrón, de 133 pb, se insertó en el sitio HincII(BE) del plásmido pBS-2B, generando así el plásmido intermediario pBS-2B(Intrón) de 7723 pb. Los clones obtenidos se verificaron por PCR (ver **Tabla 3**) y por digestión enzimática con BstEII.

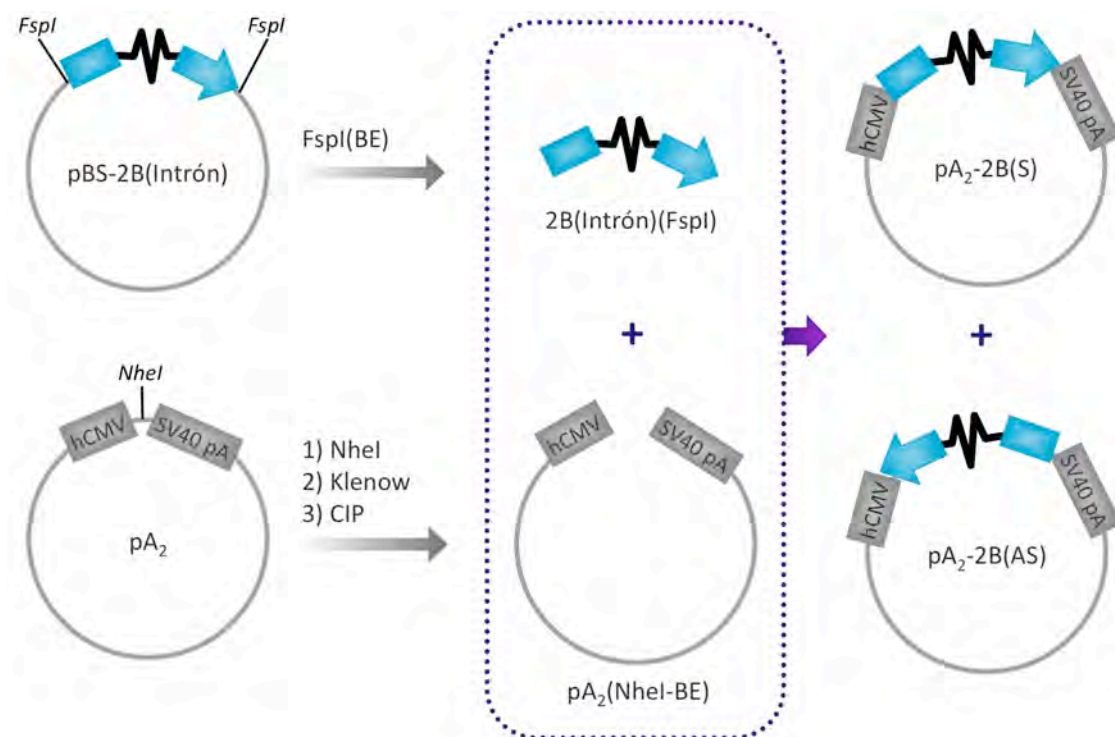
En la **Figura 36** se muestra la migración en gel de agarosa 2% de los productos de *screening* por PCR y la migración en gel de agarosa 1% de los productos de la digestión con la enzima BstEII.



**Figura 36. Migración en gel de agarosa de los fragmentos obtenidos por PCR y por digestión enzimática de los plásmidos pBS-2B(Intrón) y pBS-2B.** Se analizaron distintos clones para pBS-2B(Intrón) por PCR y por digestión con la enzima de restricción BstEII. Para la verificación por PCR, para el clon B1 se observó una banda de 468 pb evidenciando presencia del Intrón en el plásmido. Se observa la banda esperada de 335 pb para el control negativo pBS-2B. Para la verificación por digestión, se observó el patrón de bandas esperado para el clon B1. La banda que diferencia la presencia del intrón (937 pb) se observa en el patrón para el clon B1, y no se observa en el control negativo pBS-2B. M, marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Life Technologies). ND, no digerido.

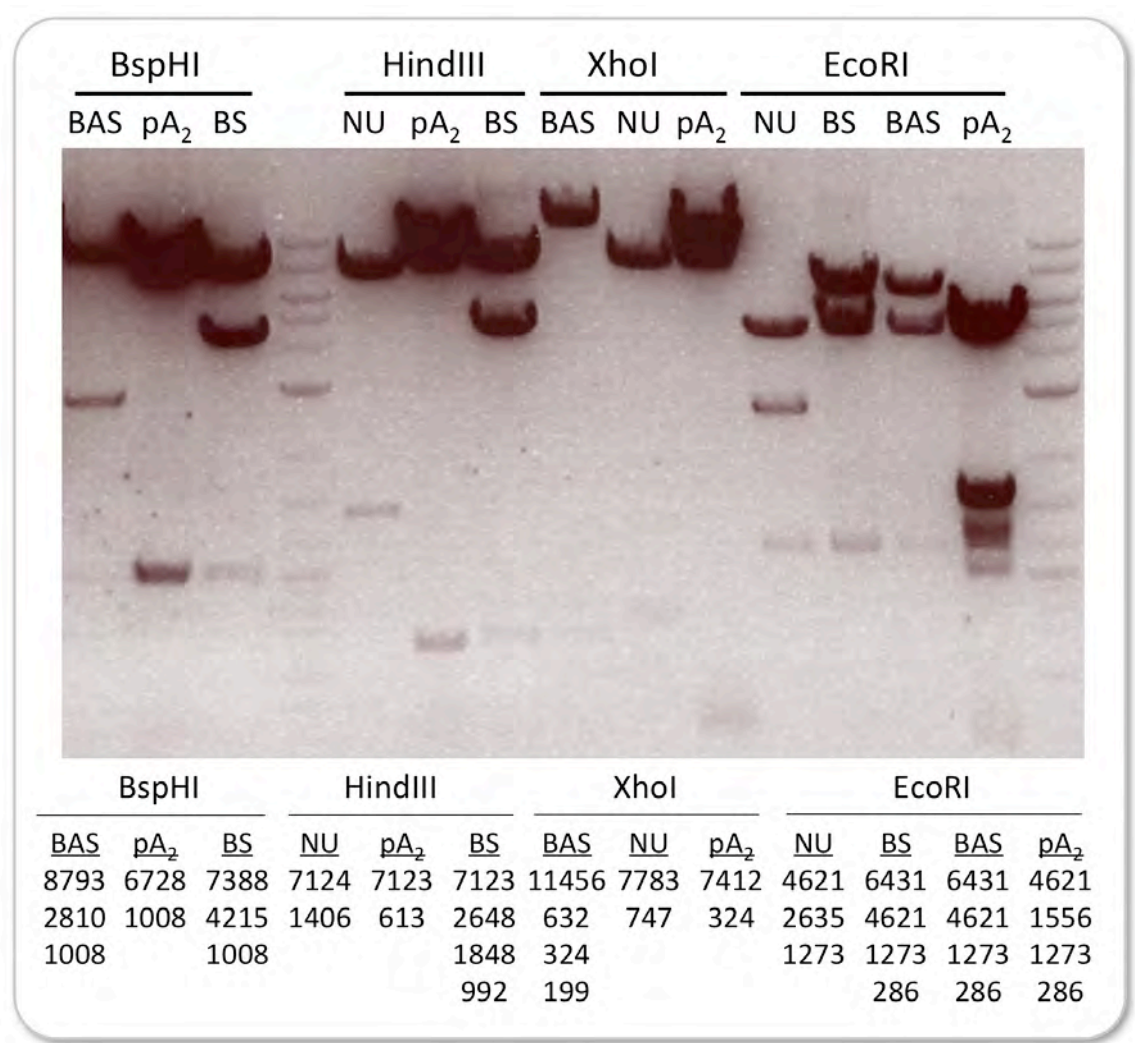
Como se observa en la **Figura 36**, se obtuvo un clon positivo (B1) para el plásmido intermediario pBS-2B(Intrón), con el cual se inició el segundo paso de la estrategia de clonado para obtener los plásmidos amplicón pA<sub>2</sub>-2B(S) y pA<sub>2</sub>-2B(AS).

En la **Figura 37** se esquematiza el segundo paso de la estrategia para obtener los plásmidos pA<sub>2</sub>-2B(S) y pA<sub>2</sub>-2B(AS), conteniendo una secuencia codificando la subunidad GluN2B -con un intrón intercalado-, en posición sentido y antisentido, respectivamente. Se digirió el plásmido pBS-2B(Intrón) con la enzima *Fsp*I, que presenta sitios de corte flanqueando la secuencia de interés y que genera extremos romos. Se aisló y se purificó el fragmento de 4871 pb conteniendo la secuencia que codifica la subunidad GluN2B -con un intrón intercalado-. Por otro lado, se digirió el plásmido pA<sub>2</sub> con la enzima *Nhe*I, se incubó con el fragmento de Klenow para generar extremos romos y se defosfataron sus extremos por incubación con la enzima CIP. Se ligaron ambos fragmentos y se obtuvieron plásmidos de 12618 bp.



**Figura 37. Estrategia de clonado para los plásmidos amplicón pA<sub>2</sub>-2B(S) y pA<sub>2</sub>-2B(AS).** Introducción de un fragmento (*Fsp*I) de 4871 pb conteniendo el ORF de GluN2B con un intrón intercalado -obtenido a partir del plásmido pBS-2B(Intrón)-, en el sitio *Nhe*I-BE del plásmido amplicón pA<sub>2</sub>.

En la **Figura 38** se muestra la migración en gel de agarosa de los productos de digestión de los plásmidos pA<sub>2</sub>-2B(S), pA<sub>2</sub>-2B(AS) y del plásmido pA<sub>2</sub> con las enzimas BspHI, HindIII, XhoI y EcoRI.



**Figura 38. Migración en gel de agarosa de los fragmentos obtenidos por digestión enzimática de los plásmidos pA<sub>2</sub>-2B(S), pA<sub>2</sub>-2B(AS) y pA<sub>2</sub>.** Por digestión con enzimas de restricción se verificaron clones positivos para los plásmidos pA<sub>2</sub>-2B(S) (BS) y pA<sub>2</sub>-2B(AS) (BAS). Se digirió también el control sin inserto pA<sub>2</sub>. Se verificaron los patrones de bandas esperados para las digestiones con las enzimas BspHI, HindIII y XhoI, que permitieron discriminar la orientación del inserto 2B(Intrón). Por digestión con la enzima EcoRI se confirmó en todos los plásmidos la presencia de una banda a la altura de 1273 pb, correspondiente a la secuencia pac de corte/empaquetamiento. En este gel se migraron también los productos de digestión del plásmido pA2-NUsc1(X59E) (NU).

Como se muestra en la **Figura 38**, las digestiones con BspHI, HindIII y XhoI permitieron discriminar la orientación sentido y antisentido del inserto. Por otro lado, por digestión con EcoRI se confirmó la presencia de la secuencia pac del módulo amplicón. Se observaron los

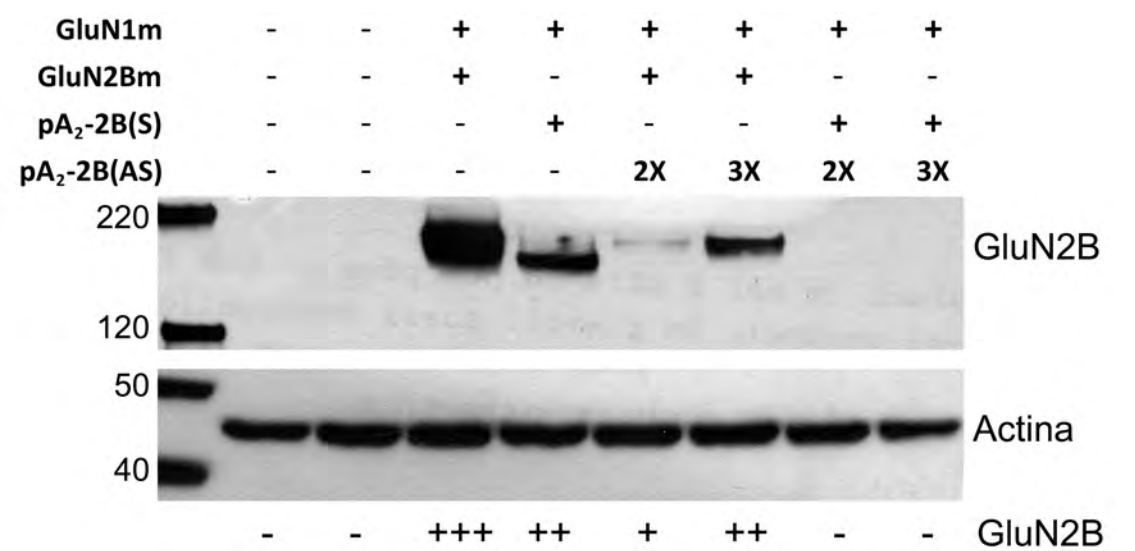


patrones de bandas esperados, verificándose la construcción de los plásmidos pA<sub>2</sub>-2B(S) y pA<sub>2</sub>-2B(AS).

## VERIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS TRANSGENES DE INTERÉS

### Plásmidos para modificar la expresión de la subunidad GluN2B

Con el objetivo de evaluar la capacidad del plásmido pA<sub>2</sub>-2B(S) para expresar la subunidad GluN2B y la capacidad del plásmido pA<sub>2</sub>-2B(AS) para producir un *knockdown* de la subunidad GluN2B, realizamos ensayos de transfección en células HEK-293 utilizando el agente transfectante Lipofectamina LTX (ver Materiales y Métodos, sección Transfección de cultivos, página 96). Transfectamos los plásmidos pA<sub>2</sub>-2B(S) y pA<sub>2</sub>-2B(AS), ensayando dos dosis del AS. Dado que la presencia de la subunidad GluN1 es esencial para poder expresar las subunidades regulatorias, co-transfectamos el plásmido GluN1m (portador de una secuencia que codifica la subunidad GluN1 de ratón). Como control positivo de la expresión de GluN2B transfectamos el plásmido GluN2Bm (portador de la secuencia que codifica la subunidad GluN2B de ratón). Cosechamos los cultivos 48 h post-transfección y los analizamos por *Western blot* (ver Materiales y Métodos, sección *Western blot*, página 31) utilizando un anticuerpo específico contra la subunidad GluN2B. Este experimento fue realizado en colaboración con la Dra. Claire Meissirel (CRNL, INSERM-CNRS). Los resultados se muestran en la **Figura 39**.



**Figura 39. Análisis de la expresión de GluN2B en cultivos transfectados con los plásmidos pA<sub>2</sub>-2B(S) y pA<sub>2</sub>-2B(AS) por Western blot.** Se transfectaron células HEK-293 con diferentes plásmidos amplicón y plásmidos controles, y a las 48 h se analizaron los niveles de GluN2B por *Western blot* utilizando un anticuerpo específico contra dicha subunidad. CN: células HEK-293 no transfectadas. GluN1m y GluN2Bm: plásmidos conteniendo las secuencias codificantes de GluN1 y GluN2B, respectivamente, de ratón. 2X, 3X: dosis del plásmido pA<sub>2</sub>-2B(AS). Actina: control de carga. En la parte superior de la figura se indican los plásmidos trasfectados y en la parte inferior se indica el nivel de expresión de GluN2B

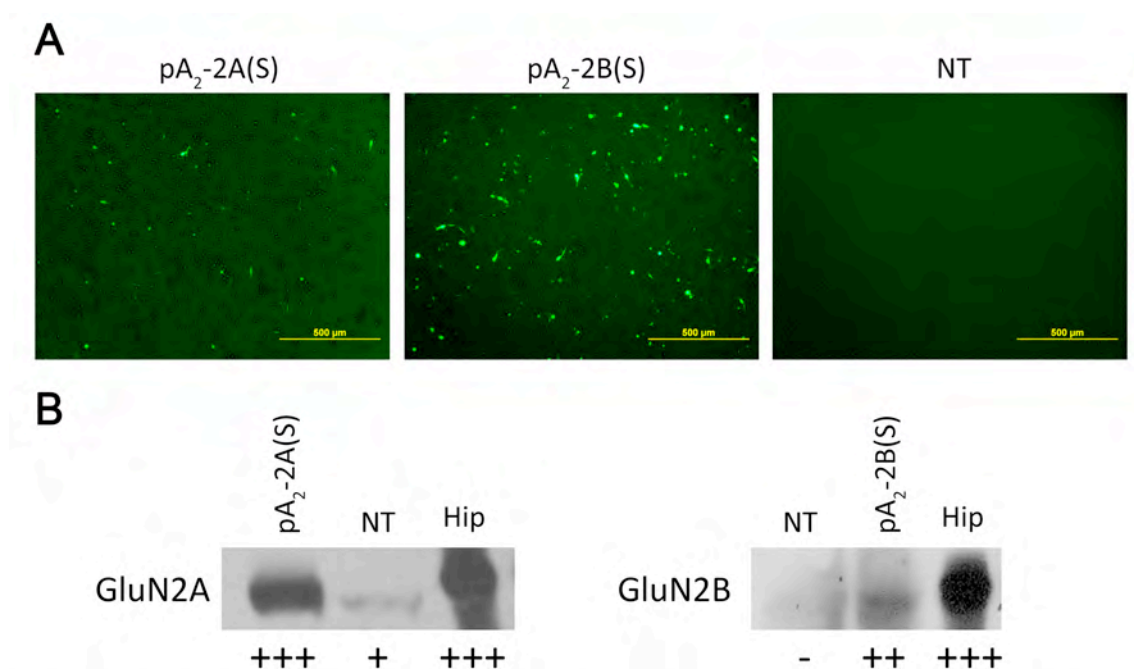
Como se muestra en la **Figura 39**, se verificó la expresión de la subunidad GluN2B por transfección con el plásmido pA<sub>2</sub>-2B(S) y la eficiencia del plásmido pA<sub>2</sub>-2B(AS) para disminuir la expresión de la subunidad GluN2B, tanto la expresada por el plásmido pA<sub>2</sub>-2B(S) como la expresada por un plásmido control GluN2Bm (GluN2B de ratón).

*La eficiencia para disminuir la expresión de la subunidad GluN2A in vitro mediante interferencia por un ARN AS contra dicha subunidad, se ensayó directamente por infección utilizando vectores amplicón producidos a partir del plásmido pA<sub>2</sub>-2A(AS) (ver sección Eficiencia de los vectores amplicón 2A(AS) in vitro, página 122).*

## Plásmidos para expresar las subunidades GluN2A y GluN2B

Nos propusimos entonces evaluar la eficiencia del plásmido pA<sub>2</sub>-2A(S) para expresar la subunidad GluN2A y corroborar la eficiencia del pA<sub>2</sub>-2B(S) para expresar la subunidad GluN2B transfectando los plásmidos pA<sub>2</sub>-2A(S) y pA<sub>2</sub>-2B(S), respectivamente, en células B104 utilizando el agente transfectante Lipofectamina LTX. 48 h post-transfección observamos los cultivos bajo microscopio de epifluorescencia, cosechamos las células y analizamos la expresión de las subunidades GluN2A y GluN2B por *Western blot* utilizando anticuerpos específicos contra las dichas subunidades. Los resultados se muestran en la **Figura 40**.

Observamos expresión de la proteína reportera EGFP en los cultivos transfectados con los plásmidos pA<sub>2</sub>-2A(S) y pA<sub>2</sub>-2B(S) (**Figura 40.A**). Como se muestra en la **Figura 40.B**, en células B104 no transfectadas detectamos expresión tenue de la subunidad GluN2A, sin detectar expresión de la subunidad GluN2B. La expresión de GluN2A fue mayor en células B104 transfectadas con el plásmido pA<sub>2</sub>-2A(S) que en células no transfectadas. De esta manera, verificamos la eficiencia del plásmido pA<sub>2</sub>-2A(S) para expresar la subunidad GluN2A. Verificamos expresión de GluN2B en células B104 transfectadas con el plásmido pA<sub>2</sub>-2B(S), corroborando de esta manera la eficiencia del plásmido pA<sub>2</sub>-2A(S) para expresar la subunidad GluN2B.



**Figura 40. Análisis por *Western blot* de la expresión de GluN2A y GluN2B en células B104 transfectadas con los plásmidos pA<sub>2</sub>-2A(S) y pA<sub>2</sub>-2B(S).** Se transfectaron células B104 los plásmidos amplicón pA<sub>2</sub>-2A(S) y pA<sub>2</sub>-2B(S) y a las 48 h se observaron los cultivos, se cosecharon y se analizaron por *Western blot* utilizando anticuerpos específicos contra GluN2A y GluN2B. **A)** Microfotografías de los cultivos obtenidas por microscopía de epifluorescencia antes de la cosecha. **B)** *Western blot* de los cultivos transfectados, utilizando anticuerpos específicos contra GluN2A y GluN2B. NT: células B104 no transfectadas. Hip: homogenato de hipocampo (control positivo). Barra de escala: 500 μm.

## PRODUCCIÓN DE VECTORES AMPLICÓN

Las producciones se realizaron siguiendo el protocolo detallado en Materiales y Métodos (sección Producción de vectores amplicón, página 97). El título de vectores amplicón y virus auxiliar y el porcentaje de contaminación con virus auxiliar para cada producción se determinó como se detalla en Materiales y Métodos (sección Titulación de producciones de vectores amplicón, página 99). En la **Tabla 4** se indica para cada producción de vectores realizada a partir de los plásmidos construidos y/o utilizados en esta Tesis, el título de vectores amplicón, el título de virus auxiliar y el porcentaje de contaminación con virus auxiliar.

Como se detalla en la **Tabla 4**, se obtuvieron producciones con títulos de hasta 10<sup>8</sup> UT/ml y contaminación con virus auxiliar entre 1% y 6%. No se detectaron revertantes en las producciones realizadas.

Vector	Purificación	Título vector (UT/ml)	Título virus auxiliar (UFP/ml)	Contaminación con virus auxiliar
2A(AS)	NO	5.5 <sup>6</sup>	1.6 <sup>5</sup>	3%
2B(AS)	NO	9.7 <sup>6</sup>	4.8 <sup>5</sup>	5%
2A(S)	NO	5.0 <sup>8</sup>	3.0 <sup>7</sup>	6%
2B(S)	NO	4.2 <sup>8</sup>	2.0 <sup>7</sup>	5%
CTL	NO	9.4 <sup>6</sup>	4.2 <sup>5</sup>	4%
2A(AS)	SI	1.4 <sup>8</sup>	7.0 <sup>5</sup>	1%
2B(AS)	SI	2.5 <sup>6</sup>	1.0 <sup>4</sup>	<1%
CTL	SI	1.3 <sup>7</sup>	1.4 <sup>5</sup>	1%

**Tabla 4. Producciones de vectores amplicón.** Se indica el nombre del vector amplicón, si se incluyó una etapa de purificación (pasaje por células ICP4+/Cre+), el título del vector amplicón expresado como Unidades Transductoras por mililitro (UT/ml), el título de virus auxiliar expresado como Unidades Formadoras de Placa por mililitro (UFP/ml), y la contaminación con virus auxiliar expresada como porcentaje de UFP/UT.

Las características de estas producciones nos permiten utilizarlas en ensayos tanto *in vitro* como *in vivo*: al presentar baja contaminación, se reducen al mínimo los efectos indeseados relacionados con la expresión de genes virales, codificados por el virus auxiliar. En la inoculación de cualquier solución intra-hipocampo, el volumen del inóculo es limitante. El alto título de estas producciones refleja una gran cantidad de partículas virales en un volumen pequeño, lo cual hace que estas producciones sean apropiadas para su uso *in vivo* intra-hipocampo.

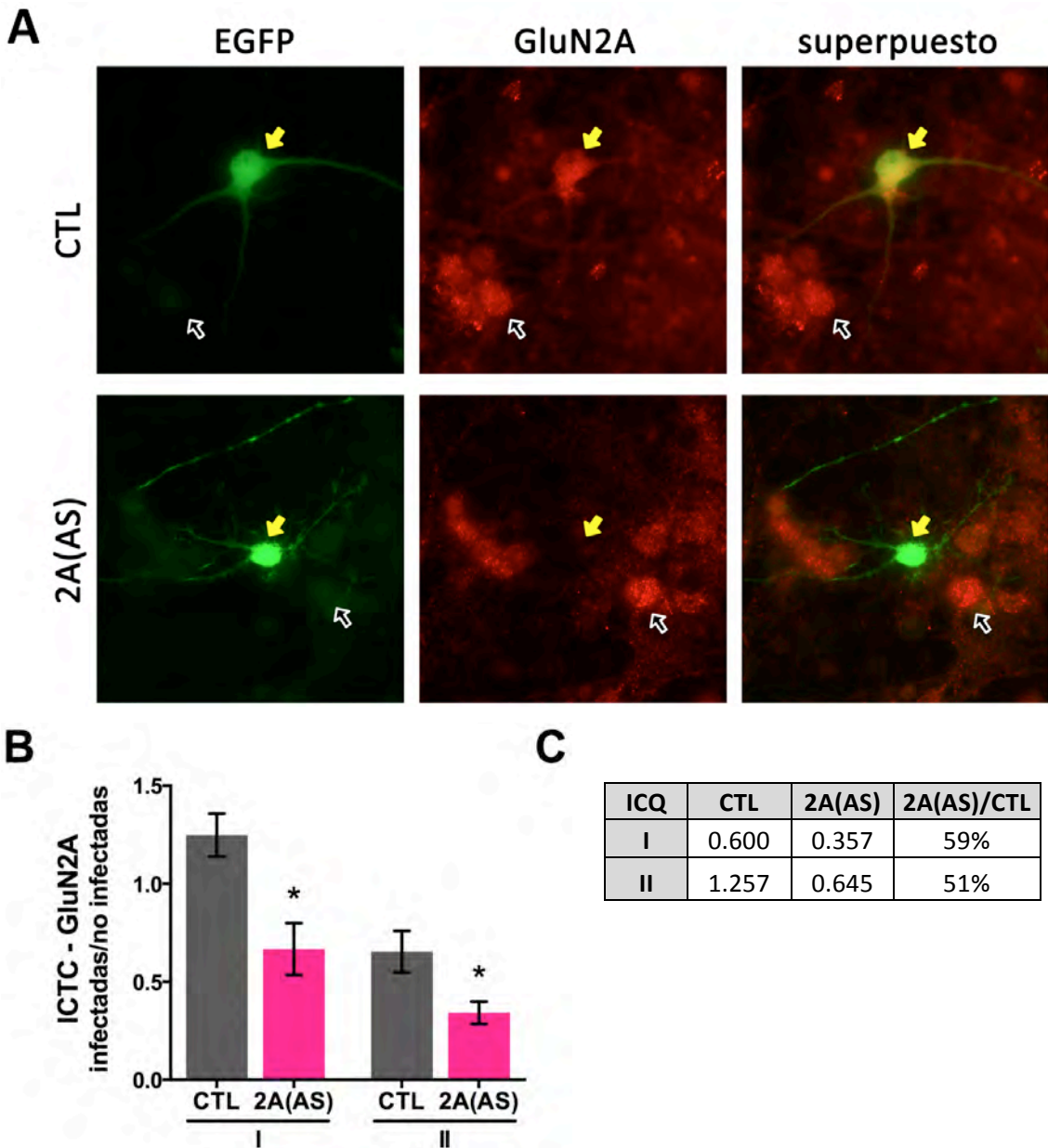
## ENSAYOS *IN VITRO* UTILIZANDO VECTORES AMPLICÓN

Una vez contruidos los vectores amplicón conteniendo secuencias que codifican ARN AS contra las subunidades GluN2A y GluN2B, nos propusimos evaluar su capacidad para disminuir la expresión de dichas subunidades. Para ello, infectamos cultivos primarios de neuronas maduros con los vectores 2A(AS) y 2B(AS) y evaluamos la expresión de las subunidades GluN2A y GluN2B mediante ensayos de inmunocitoquímica y/o *Western blot*.

### Eficiencia de los vectores amplicón 2A(AS) *in vitro*

Para evaluar la capacidad del vector amplicón 2A(AS) para disminuir la expresión de la subunidad GluN2A, infectamos cultivos primarios de neuronas de hipocampo maduros con

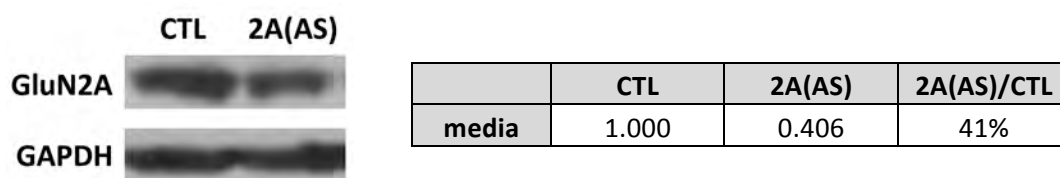
vectores 2A(AS) y vectores CTL, a una MOI de 3 vectores/célula (ver Materiales y Métodos, sección Infección de cultivos, página 100). Fijamos los cultivos 48 h post-infección y analizamos la expresión de la subunidad GluN2A por inmunocitoquímica (ver Capítulo I, Materiales y Métodos, sección Inmunocitoquímica, página 30) utilizando un anticuerpo específico contra la subunidad GluN2A. En la **Figura 41** se muestran los resultados obtenidos.



**Figura 41. Inmunocitoquímica contra GluN2A en cultivos primarios de neuronas (14-17 DIV) 48 h post-infección con vectores amplicón 2A(AS) y CTL. A)** Microfotografías representativas de cada grupo. Flechas amarillas: células infectadas; flechas vacías: células no infectadas, a modo de ejemplo. Aumento: 600X. **B)** Diagrama de barras de las medias  $\pm$  SEM del promedio de la Inmunofluorescencia Celular Total Corregida (ICTC) en neuronas infectadas/no infectadas en dos ensayos independientes (ICQ I y II). Se contó un promedio de 15 células/campo. Comparación entre grupos por t test para muestras no apareadas. \* $p < 0.05$ . Grupos I-CTL, I-2A(AS), II-CTL y II-2A(AS); N=4, 9, 21 y 16 campos, respectivamente. **C)** Tabla indicando la media de cada grupo y la relación entre las medias (2A(AS)/CTL) para cada ensayo.

En la **Figura 41.A** se muestran microfotografías de los cultivos neuronales infectados con vectores 2A(AS) y CTL, luego del ensayo de inmunocitoquímica utilizando un anticuerpo específico contra la subunidad GluN2A. Las células infectadas se identificaron por la expresión de la proteína reportera EGFP, codificada por secuencias presentes en los vectores 2A(AS) y CTL. En los paneles A, B y C se puede observar que las células infectadas con el vector CTL presentan inmunomarcación similar a las células no infectadas. En los paneles D, E y F, las células infectadas con el vector 2A(AS) presentan inmunomarcación más tenue que las células no infectadas. En la **Figura 41.B** se muestra el diagrama de barras de las medias  $\pm$  SEM de la Inmunofluorescencia Celular Total Corregida (ICTC) en neuronas infectadas/no infectadas en dos ensayos independientes. En la **Figura 23.C** se detallan las medias de la ICTC y la relación entre los grupos infectados con vectores 2A(AS) y CTL para cada ensayo. En 2 ensayos independientes, hubo disminución significativa -de alrededor del 45%- en la inmunomarcación contra GluN2A en células infectadas con el vector 2A(AS), demostrando de esta manera la eficiencia de los vectores 2A(AS) para disminuir la expresión de la subunidad GluN2A *in vitro*.

En un segundo ensayo para evaluar la capacidad del vector amplicón 2A(AS) para disminuir la expresión de la subunidad GluN2A, infectamos cultivos primarios de neuronas corticales con los vectores 2A(AS) y CTL a una MOI de 3 vectores/células célula (ver Materiales y Métodos, sección Infección de cultivos primarios, página 100), cosechamos los cultivos 48 h post-infección y analizamos en ellos la expresión de la subunidad GluN2A mediante *Western blot* (ver Capítulo I, Materiales y Métodos, sección *Western blot*, página 31) utilizando un anticuerpo específico contra GluN2A. La **Figura 42** muestra el análisis de los niveles de GluN2A en cultivos de neuronas infectados con los vectores 2A(AS) y CTL en un ensayo de *Western blot*.



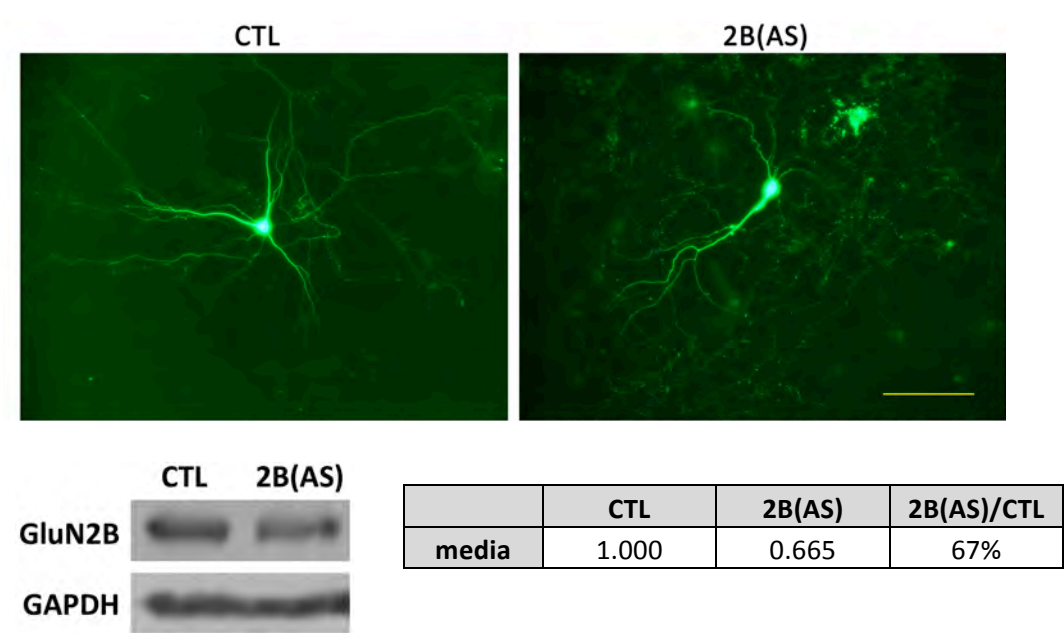
**Figura 42. Niveles de GluN2A en cultivos primarios de neuronas infectadas con vectores amplicón 2A(AS) y CTL.** Se indican las medias del nivel de GluN2A y la relación entre las medias de los grupos 2A(AS)/CTL en cultivos primarios de neuronas corticales infectados con vectores 2A(AS) y CTL (MOI 3 vectores/célula), cosechados 48 h después y analizados por *Western blot* utilizando un anticuerpo específico contra GluN2A. Los valores obtenidos se normalizaron al control de carga GAPDH y al grupo CTL. **Inserto a la izquierda:** bandas representativas de cada grupo. CTL, N=1; 2A(AS), N=2.

En este ensayo preliminar observamos una disminución de un 59% en el nivel de expresión de la subunidad GluN2A en los cultivos infectados con vectores 2A(AS), con respecto al nivel en los cultivos infectados con vectores CTL.

Los resultados obtenidos demuestran que la infección con vectores 2A(AS) es eficiente para producir una disminución significativa de los niveles de la subunidad GluN2A *in vitro*.

### Eficiencia de los vectores amplicón 2B(AS) *in vitro*

Para evaluar la capacidad del vector 2B(AS) para disminuir la expresión de la subunidad GluN2B, infectamos cultivos primarios de neuronas de hipocampo maduros con los vectores 2B(AS) y CTL, a una MOI de 3 vectores/célula (ver Materiales y Métodos, sección Infección de cultivos, página 100). 48 h post-infección observamos los cultivos bajo microscopio de fluorescencia para verificar la presencia de neuronas infectadas. Cosechamos los cultivos 48 h después de la infección y analizamos los niveles de GluN2B por *Western blot* (ver Capítulo I, Materiales y Métodos, sección *Western blot*, página 31) utilizando un anticuerpo específico contra GluN2B. En la **Figura 43** se muestran los resultados obtenidos.



**Figura 43. Niveles de GluN2B en cultivos primarios de neuronas (14-22 DIVs) infectados con vectores amplicón 2B(AS) y CTL.** Cultivos primarios de neuronas de hipocampo fueron infectados con vectores 2B(AS) y CTL a una MOI de 3 vectores/célula. 48 h post-infección los cultivos fueron observados bajo microscopio de epifluorescencia y luego fueron cosechados y analizados por *Western blot*. **A.** Microfotografías de los cultivos infectados con vectores 2B(AS) y CTL, obtenidas 48 h post-infección. Barra de escala 100  $\mu$ m. **B.** Tabla indicando las medias de los niveles de GluN2B evaluados por *Western*

*blot*, normalizados al nivel de GAPDH y al grupo CTL. La determinación se realizó por duplicado. **Inserto a la izquierda:** bandas representativas de cada grupo. CTL: N=1; 2B(AS), N=1.

Como se observa en la **Figura 43**, comprobamos la presencia de neuronas infectadas a través de la observación de la proteína reportera EGFP. En este ensayo, se verificó por *Western blot* una disminución del 33% en el nivel de expresión de la subunidad GluN2B en los cultivos infectados con vectores 2B(AS), con respecto al nivel en los cultivos infectados con vectores CTL, indicando que la infección con el vector 2B(AS) sería eficiente para producir una disminución de la expresión de GluN2B *in vitro*. Dado que el anticuerpo contra GluN2B utilizado para *Western blot* no resultó adecuado para el ensayo de inmunocitoquímica, no pudimos verificar los resultados por dicha técnica.

## ENSAYOS *IN VIVO* UTILIZANDO VECTORES AMPLICÓN

Una vez demostrada la eficiencia de los vectores amplicón para disminuir la expresión de las subunidades del RNMDA *in vitro*, nos propusimos evaluar la capacidad de estos vectores *in vivo* y estudiar sus efectos en el aprendizaje y la memoria. Como se detalla en Materiales y Métodos (sección Control de los posibles efectos de la cirugía, de la inyección estereotáxica y de los vectores, página 103), se verificó que la cirugía y la inoculación del vector no afectaran el desempeño de los animales en las tareas comportamentales de CA y EI.

Mediante cirugía esterotáxica inoculamos bilateralmente ratas adultas jóvenes con volúmenes de entre 1 y 2  $\mu$ l de suspensión de vectores amplicón portadores de secuencias codificantes de AS para las subunidades GluN2A o GluN2B, o vectores CTL, intra-hipocampo. Esperamos 5 días luego de la inoculación para permitir la recuperación de los animales y la expresión de las secuencias codificadas por los vectores, y entonces expusimos los animales a una o a dos sesiones de CA de 5 min de duración, evaluando su desempeño por la cuantificación del número de cruzamientos y de elevaciones min a min durante cada sesión.

Los animales fueron divididos en diferentes grupos para analizar la expresión de las subunidades GluN1, GluN2A y GluN2B en hipocampo. Los grupos 1CA fueron eutanasiados 2 h después de una única sesión de CA. Los grupos 2CA-2EI fueron expuestos a dos sesiones de CA separadas por 24 h, a las 2 h fueron entrenados en EI, 24 h después fueron evaluados en EI y, finalmente, 2 h después fueron eutanasiados. En la **Figura 44** se esquematiza el diseño experimental.



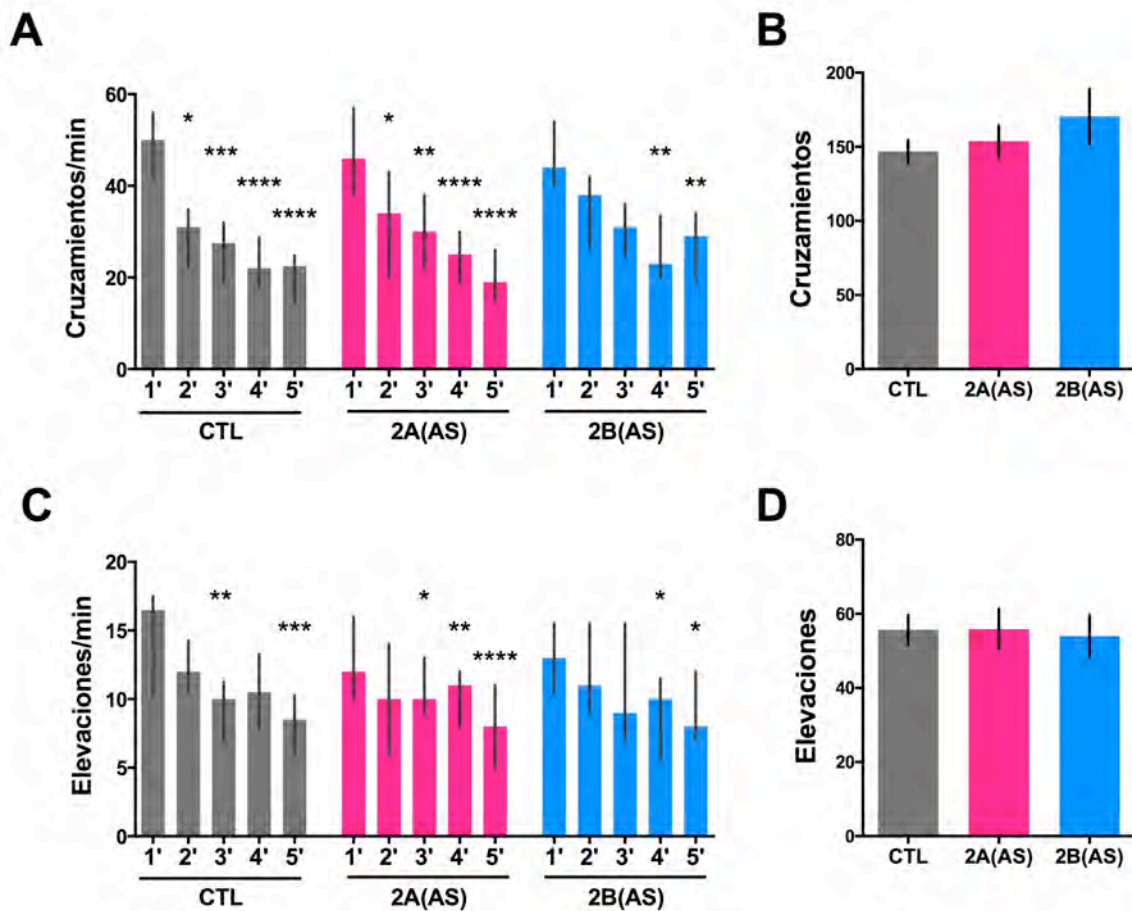


**Figura 44. Esquema del diseño experimental.** Mediante cirugía estereotáxica, se inocularon intra-hipocampo vectores amplicón CTL, 2A(AS) y 2B(AS) en ratas adultas jóvenes. 5 días post-inoculación se iniciaron los estudios comportamentales. Algunos animales fueron expuestos a una única sesión de CA y fueron eutanasiados 2 h después la tarea, disecándose los hipocampos para su posterior análisis por *Western blot* (grupos 1CA). Los animales de los grupos 2CA-2EI fueron expuestos a dos sesiones de CA separadas por 24 h, 2 horas después fueron entrenados en EI, y a las 24 h fueron evaluadas en EI. 2 h después se eutanasiaron los animales y se obtuvieron los hipocampos para su posterior análisis por *Western blot*.

En la **Figura 45** se muestra el desempeño en el CA de los animales inoculados con vectores CTL, 2A(AS) y 2B(AS) en la primera o en la única sesión de CA.

Para los cruzamientos realizados por min (**Figura 45.A**), hubo disminuciones significativas en los min 2, 3, 4 y 5 con respecto al primer min de la sesión, en los grupos inoculados con vectores CTL y 2A(AS), y en los min 4 y 5 con respecto al primer min de la sesión, en el grupo inoculado con vectores 2B(AS). Tanto para los cruzamientos en el primer min de la sesión, como para el total de cruzamientos realizados por cada grupo durante los 5 min de la sesión (**Figura 45.B**), no hubo diferencias significativas entre los grupos inoculados con vectores 2A(AS) y 2B(AS) vs. el grupo inoculado con vectores CTL.

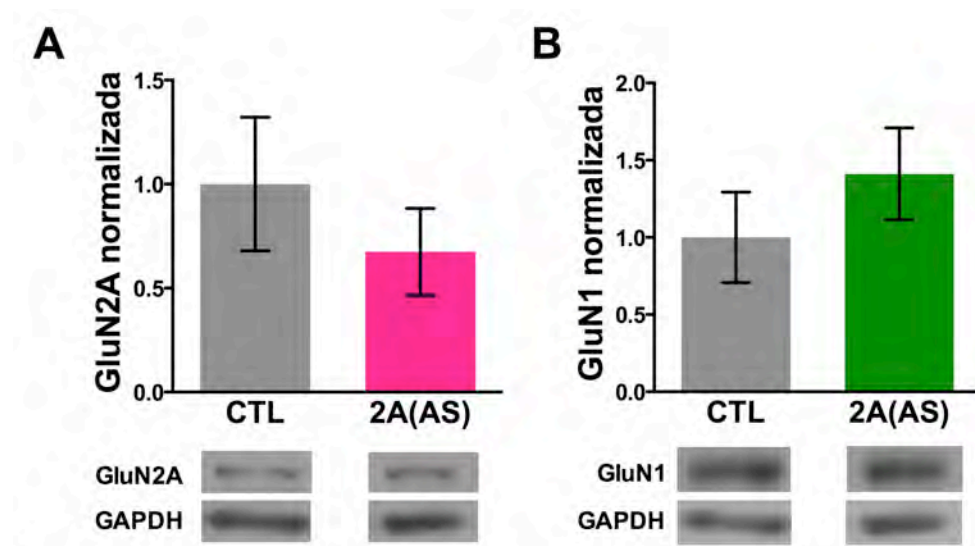
Para las elevaciones efectuadas por min (**Figura 45.C**), hubo disminuciones en los min 3 y 5 con respecto al primer min de la sesión en el grupo inoculado con vectores CTL; en los min 3, 4 y 5 con respecto al primer min de la sesión para el grupo inoculado con vectores 2A(AS); y en los min 4 y 5, en el grupo inoculado con vectores 2B(AS). Tanto para las elevaciones evaluadas en el primer min de la sesión (**Figura 45.C**), como para el total de elevaciones realizadas por cada grupo durante los 5 min de la sesión (**Figura 45.D**), no observamos diferencias significativas entre los grupos inoculados con vectores 2A(AS) y 2B(AS) vs. el grupo inoculado con vectores CTL.



**Figura 45. Desempeño en la primera (1CA) o la única (2CA-2EI) sesión de CA de animales adultos jóvenes inoculados intra-hipocampo con vectores amplicón CTL, 2A(AS) y 2B(AS).** Diagramas de barras de las medianas con rangos intercuartiles (0,25; 0,75) de los cruzamientos (A) y las elevaciones (C) durante cada min de la sesión, y del total de cruzamientos (B) y elevaciones (D) en los 5 min de sesión. CTL, 2A(AS) y 2B(AS): barras grises, rosas y azules, respectivamente, animales inoculados con vectores CTL, 2A(AS) y 2B(AS), respectivamente. Comparación entre los min 2, 3, 4 y 5 vs. el primer min de la sesión para cada grupo, por prueba de Friedman, seguida por prueba de comparaciones múltiples de Dunn. Comparación entre grupos 2A(AS) y 2B(AS) vs. grupo CTL, del primer min de cada sesión, por prueba de Kruskal-Wallis, seguida por prueba de comparaciones múltiples de Dunn. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ . CTL, N=14; 2A(AS), N=19, 2B(AS), N=9.

Estos resultados indican que los animales inoculados con vectores CTL, 2A(AS) y 2B(AS) tuvieron MT y se habituaron al ambiente novedoso cuando fueron expuestos al CA por 5 min. Los animales del grupo 2A(AS), a pesar de haber sido inoculados con vectores capaces de disminuir *in vitro* la expresión de la subunidad GluN2A, no evidenciaron un deterioro cognitivo respecto a esta MT con componentes espaciales. Por otro lado, los animales inoculados con 2B(AS) se habituaron al ambiente novedoso con dificultad y más tardíamente que los inoculados con vectores CTL o 2A(AS).

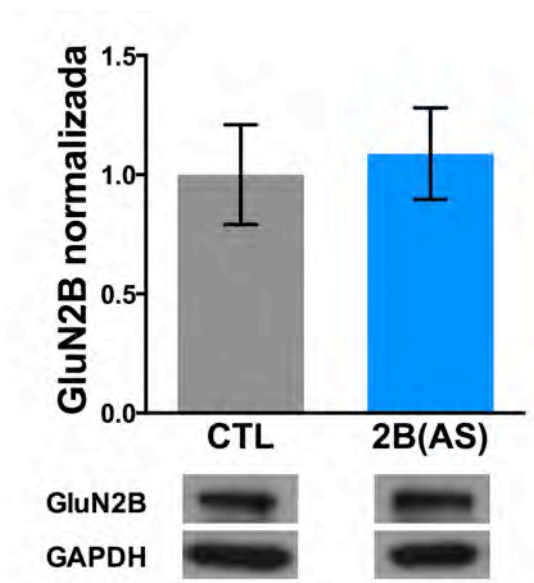
El grupo 1CA fue eutanasiado 2 h después de la tarea. Se obtuvieron los hipocampos derecho e izquierdo de cada animal, separando las zonas inoculadas tomando como referencia la zona de inoculación en la superficie de la corteza (pequeñas hendiduras) (N=6 hipocampos/grupo). Las muestras se analizaron por *Western blot*, utilizando los anticuerpos específicos para las subunidades GluN1, GluN2A y GluN2B, y para el control de carga (GAPDH) (ver Materiales y Métodos, Sección *Western blot*, página VER). Los niveles de subunidades del RNMDA analizados por *Western blot* se muestran en la **Figura 46** para la inoculación con vectores 2A(AS), y en la **Figura 47** para la inoculación con vectores 2B(AS).



**Figura 46. Niveles de las subunidades GluN2A (A) y GluN1 (B) en hipocampos de ratas inoculadas con vectores 2A(AS) y CTL.** Se inocularon vectores amplicón 2A(AS) y CTL intra-hipocampo y bilateralmente en ratas adultas jóvenes. 5 días post-inoculación se evaluó el desempeño de los animales en una sesión de CA. 2 horas después se eutanasiaron los animales y se obtuvieron los hipocampos (izquierdo y derecho) individualmente. Se analizaron los niveles de subunidades GluN2A (**A**) y GluN1 (**B**) por *Western blot*. Los valores de las subunidades se normalizaron al control de carga GAPDH y al grupo CTL. **A.** Nivel de la subunidad GluN2A (medias ± SEM): CTL, 1.000 ± 0.321; 2A(AS), 0.674 ± 0.209; **B)** Nivel de la subunidad GluN1 (medias ± SEM): CTL, 1.000 ± 0.293; 2A(AS), 1.411 ± 0.298. Comparación entre grupos por t test para muestras no apareadas. **Insertos inferiores:** bandas representativas de cada grupo. N=6 para todos los grupos.

Como se muestra en la **Figura 46**, no hubo diferencias significativas en los niveles ni de GluN2A ni de GluN1 entre hipocampos de ratas inoculadas con vectores 2A(AS) y con vectores CTL. En este ensayo preliminar, el número de muestras analizadas fue bajo (N=6 por grupo) y la dispersión fue alta. Es factible que una disminución de alrededor del 59%, como la alcanzada *in vitro* en células en cultivo, no se haya reflejado en una disminución equivalente *in vivo*, especialmente cuando se analizó una porción de tejido conteniendo, sin duda, muchas más células no alcanzadas por los vectores. En resumen, no se alcanzó una definición estadística

respecto a la capacidad y la especificidad de los vectores 2A(AS) para disminuir la expresión de la subunidad GluN2A *in vivo*.



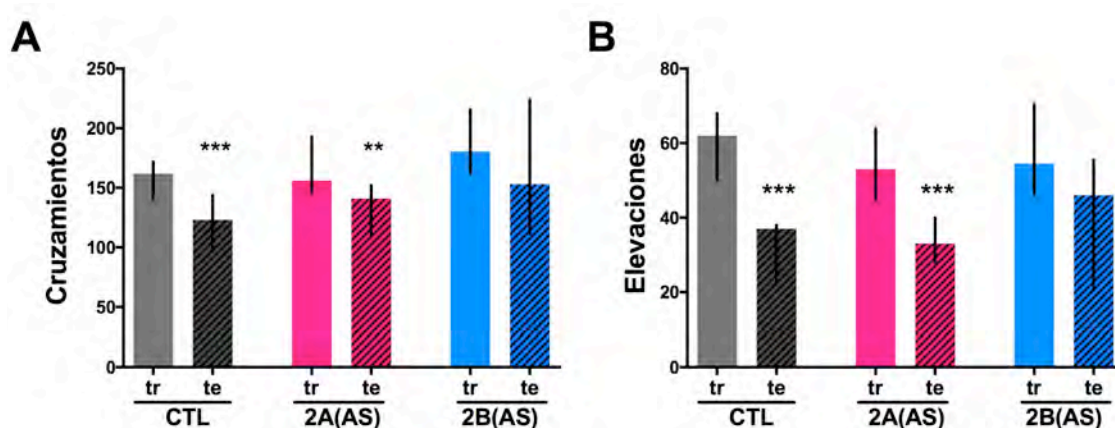
**Figura 47. Nivel de la subunidad GluN2B en hipocampos de ratas inoculadas con vectores 2B(AS) y CTL.** Se inocularon vectores amplicón CTL y 2B(AS) intra-hipocampo y bilateralmente en ratas adultas. 5 días post-inoculación se evaluó el desempeño de los animales en una sesión de CA. 2 horas después se eutanasiaron los animales y se obtuvieron los hipocampos (izquierdo y derecho) individualmente. Se analizó el nivel de la subunidad GluN2B por Western blot. Los valores de GluN2B se normalizaron al control de carga GAPDH y al grupo CTL. Niveles de la subunidad GluN2B (medias  $\pm$  SEM): CTL,  $1.005 \pm 0.2099$ , N=6; 2B(AS),  $1.093 \pm 0.1927$ , N=6; Comparación entre grupos por t test para muestras no apareadas. **Insertos inferiores:** bandas representativas de cada grupo.

Como se muestra en la **Figura 47**, no hubo diferencia significativa en los niveles de la subunidad GluN2B entre hipocampos de animales inoculados con vectores 2B(AS) y con vectores CTL. Este ensayo realizado con un número de muestra reducido (N=6) no permitió alcanzar una definición estadística, por lo que consideramos que este fue un ensayo preliminar. Es factible que una disminución de alrededor del 33%, como la alcanzada *in vitro* en células en cultivo en un ensayo preliminar, no se refleje en una disminución equivalente *in vivo*, especialmente cuando se analiza una porción de tejido que contiene, sin duda, muchas más células no alcanzadas por los vectores.

Antecedentes de nuestro laboratorio (Cheli y col., 2006) demuestran que en animales inoculados con vectores expresando secuencias antisentido contra la subunidad GluN1, la disminución de la expresión de dicha subunidad en tan sólo un 6-7% de las neuronas piramidales de hipocampo fue suficiente para alterar el desempeño en tareas

comportamentales. Sin embargo, en esos ensayos, la evaluación de los niveles de subunidades se realizó en cortes de hipocampo analizados mediante inmunohistoquímica y en membranas sinaptosomales mediante *Western blot*, en lugar de en homogenatos de hipocampo, como fue realizado en esta Tesis. De esta manera, no podemos descartar que los vectores 2A(AS) y 2B(AS) hayan sido efectivos para disminuir la expresión de las subunidades, y en el futuro se analizará la expresión de subunidades de manera más restringida, por ejemplo, mediante inmunohistoquímica.

Como se mencionó previamente, 24 h después de la primera sesión de CA, el grupo 2CA-2EI fue evaluado en una segunda sesión de CA. En la **Figura 48** se muestra el desempeño de animales inoculados con vectores CTL, 2A(AS) y 2B(AS) en dos sesiones de CA separadas por 24 h.



**Figura 48. Desempeño de animales inoculados con vectores CTL, 2A(AS) y 2B(S) en dos sesiones de CA separadas por 24 h.** Diagramas de barras de las medianas con rangos intercuartiles (0,25; 0,75) para los cruzamientos (**A**) y elevaciones (**B**) en la sesión de entrenamiento (tr, barras lisas) y en la sesión de prueba (te, barras rayadas) de animales inoculados con vectores CTL, 2A(AS) y 2B(AS) (barras grises, rosas y azules, respectivamente). Comparación entre entrenamiento y test por prueba de Wilcoxon. Comparación entre grupos 2A(AS) y 2B(AS) vs. grupo CTL por prueba de Kruskal-Wallis, seguido por prueba de comparaciones múltiples de Dunn. \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . CTL, N=11; 2A(AS), N=15; 2B(AS), N=6.

Como se muestra en la **Figura 48.A**, hubo diferencias significativas entre los cruzamientos en la segunda sesión (prueba) y la primera sesión (entrenamiento) para los animales inoculados con vectores CTL y 2A(AS). Para los cruzamientos en la sesión de entrenamiento, no observamos diferencias significativas entre los grupos inoculados con vectores 2A(AS) y 2B(AS) vs. el grupo inoculado con vectores CTL. No hubo diferencia significativa entre los cruzamientos entre la segunda y la primera sesión de CA en los animales

inoculados con vectores 2B(AS), lo que indicaría que estos animales no habrían reconocido el ambiente.

Como se muestra en la **Figura 48.B**, hubo diferencias significativas entre las elevaciones realizadas en la sesión de prueba y en la sesión de entrenamiento en los animales inoculados con vectores CTL y 2A(AS). Para las elevaciones en la sesión de entrenamiento, no hubo diferencias significativas entre los grupos inoculados con vectores 2A(AS) y 2B(AS) vs. el grupo inoculado con vectores CTL. No observamos diferencias significativas entre las elevaciones de la sesión de prueba y la de entrenamiento en los animales inoculados con vectores 2B(AS), lo que da mayor sustento los resultados obtenidos para el número de cruzamientos, corroborando que estas ratas no formaron una LTM.

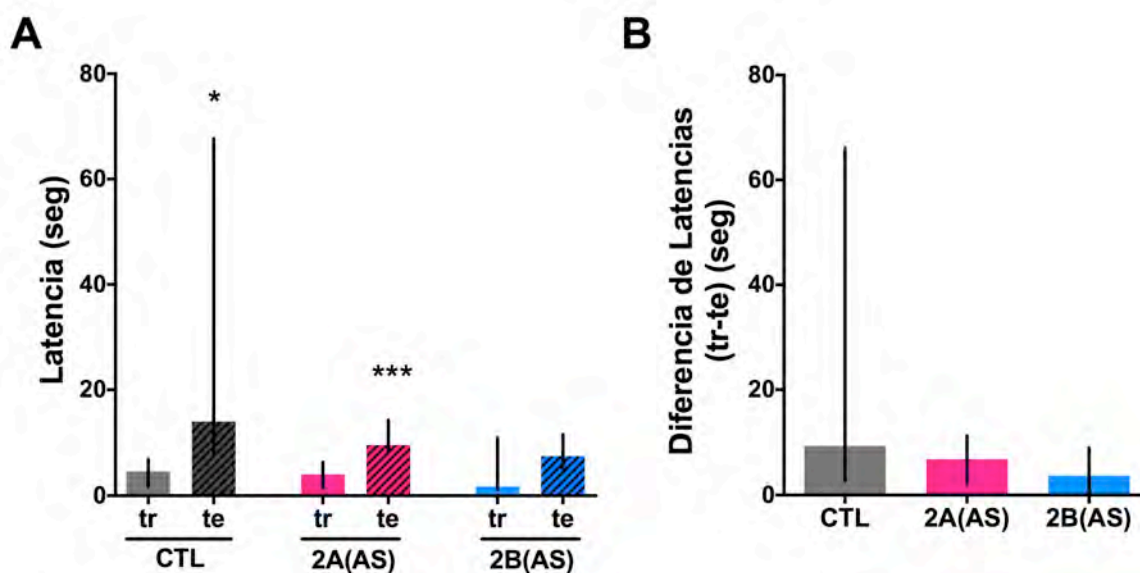
Es importante notar que los resultados obtenidos para el grupo de animales inoculados con vectores 2B(AS) son preliminares, ya que el número de muestras es bajo (N=6), por lo que debería ser estudiado un número mayor de animales para confirmarlos.

Estos resultados indican que los animales inoculados con vectores CTL y 2A(AS) evidenciaron formación de LTM de habituación y, por lo tanto, que la inoculación con vectores 2A(AS) no tuvo un efecto deletéreo sobre la formación de este tipo de memoria.

A las 2 h de la segunda sesión de CA, animales inoculados con vectores CTL, 2A(AS) y 2B(AS), fueron expuestos a una primera sesión de EI en su modalidad *step-through* (Materiales y Métodos, Evitación Inhibitoria); 24 h más tarde fueron expuestos a una sesión de prueba de EI. En ambas sesiones se evaluaron las latencias de descenso de la plataforma.

En la **Figura 49** se muestra el desempeño los animales inoculados con vectores CTL, 2A(AS) y 2B(AS), en una sesión de entrenamiento en EI y una sesión de prueba realizada 24 h después.

En los grupos inoculados con vectores CTL y 2A(AS) las latencias en la sesión de prueba fueron significativamente mayores en la sesión de prueba con respecto a las latencias en la sesión de entrenamiento. Es decir que los animales inoculados con vectores 2A(AS) y CTL formaron y expresaron MLP de EI. No hubo diferencia significativa entre las latencias de prueba y entrenamiento para el grupo inoculado con vectores 2B(AS), lo que sugiere que estos animales no fueron capaces de formar y/o expresar una MLP de EI.



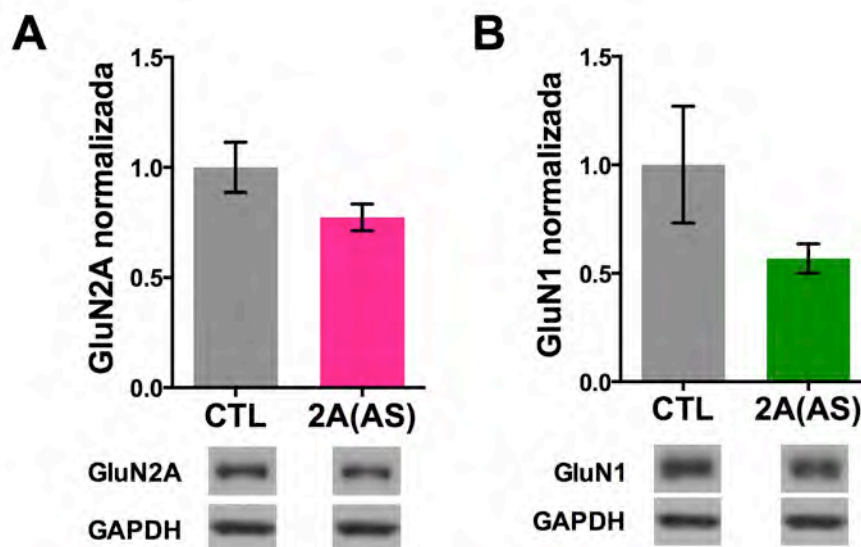
**Figura 49. Desempeño de animales inoculados con vectores CTL, 2A(AS) y 2B(AS) en la tarea de EI.** **A)** Diagramas de barras de las medianas con rangos intercuartiles (0,25; 0,75) para las latencias medidas en la sesión de entrenamiento (tr, barras lisas) y en la sesión de prueba (te, barras rayadas) en la tarea de EI en animales inoculados con vectores CTL, 2A(AS) y 2B(AS) (barras grises, rosas y azules, respectivamente). **B)** Diagramas de barras de las medianas con rangos intercuartiles (0,25; 0,75) para la diferencia de las latencias (prueba-entrenamiento) para los mismos grupos que en **A)**. CTL, N=11; 2A(AS), N=14; 2B(AS), N=6.

Es importante notar que los resultados obtenidos para el grupo de animales inoculados con vectores 2B(AS) deben considerarse aún preliminares, ya que el número de muestras es relativamente bajo (N=6). Un número mayor de animales debería ser estudiado para poder obtener una definición estadística.

A las 2 h de finalizada la prueba de EI, los animales fueron eutanasiados. Se obtuvieron sus hipocampos y se realizaron homogenatos individuales que fueron analizados mediante Western blot para evaluar los niveles de las subunidades GluN1 y GluN2A (ver Materiales y Métodos, sección Western blot).

En la **Figura 50** se muestran los niveles de las subunidades GluN2A y GluN1 en hipocampos de animales inoculados con vectores 2A(AS) y CTL, expuestos a dos sesiones de CA separadas por 24 h, entrenados en EI 2 h después, sometidos a una sesión de prueba a las 24 h y eutanasiados 2 h después de finalizados los ensayos comportamentales.





**Figura 50. Niveles de GluN2A (A) y GluN1 (B) en hipocampos de ratas adultas jóvenes inoculadas con vectores 2A(AS) y CTL.** Los animales fueron inoculados intra-hipocampo, bilateralmente. 5 días post-inoculación fueron expuestos a dos sesiones de CA separadas por 24 h, 2 h después fueron entrenados en EI, y a las 24 h fueron sometidos a una sesión de prueba de EI. 2 h después del último ensayo comportamental se eutanasiaron los animales y se disecaron los hipocampos (izquierdo y derecho). Los valores de las subunidades se normalizaron al control de carga GAPDH y al grupo CTL. Se graficaron las medias  $\pm$  SEM para los niveles de GluN2A (**A**) y GluN1 (**B**) normalizados. **A**) CTL,  $1.000 \pm 0.114$ , N=16; 2A(AS),  $0.774 \pm 0.061$ , N=17. **B**) CTL,  $1.000 \pm 0.289$ , N=5; 2A(AS),  $0.567 \pm 0.068$ , N=8. Comparación entre grupos por t test para muestras no apareadas. **Insertos inferiores:** bandas representativas de cada grupo.

Como se muestra en la **Figura 50**, y aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas en los niveles de GluN2A (**Figura 50.A**) ni de GluN1 (**Figura 50.B**) entre hipocampos de ratas inoculadas con vectores 2A(AS) e hipocampos de ratas inoculadas con vectores CTL, observamos una marcada tendencia de disminución en los hipocampos de animales inoculados con vectores 2A(AS), tanto para la subunidad GluN2A ( $p=0.0843$ ) como para la subunidad GluN1 ( $p=0.0797$ ).

La cantidad de células afectadas *in vivo* es pequeña comparada con la gran cantidad de células no infectadas, por lo que, de producirse un KD de las subunidades en las células infectadas, este resultado podría verse enmascarado en el nivel total debido a la gran cantidad de células no que no presentarían alteración en los niveles de las subunidades. En un futuro sería apropiado evaluar los niveles proteicos de manera más restringida, por ejemplo mediante ensayos de inmunohistofluorescencia.

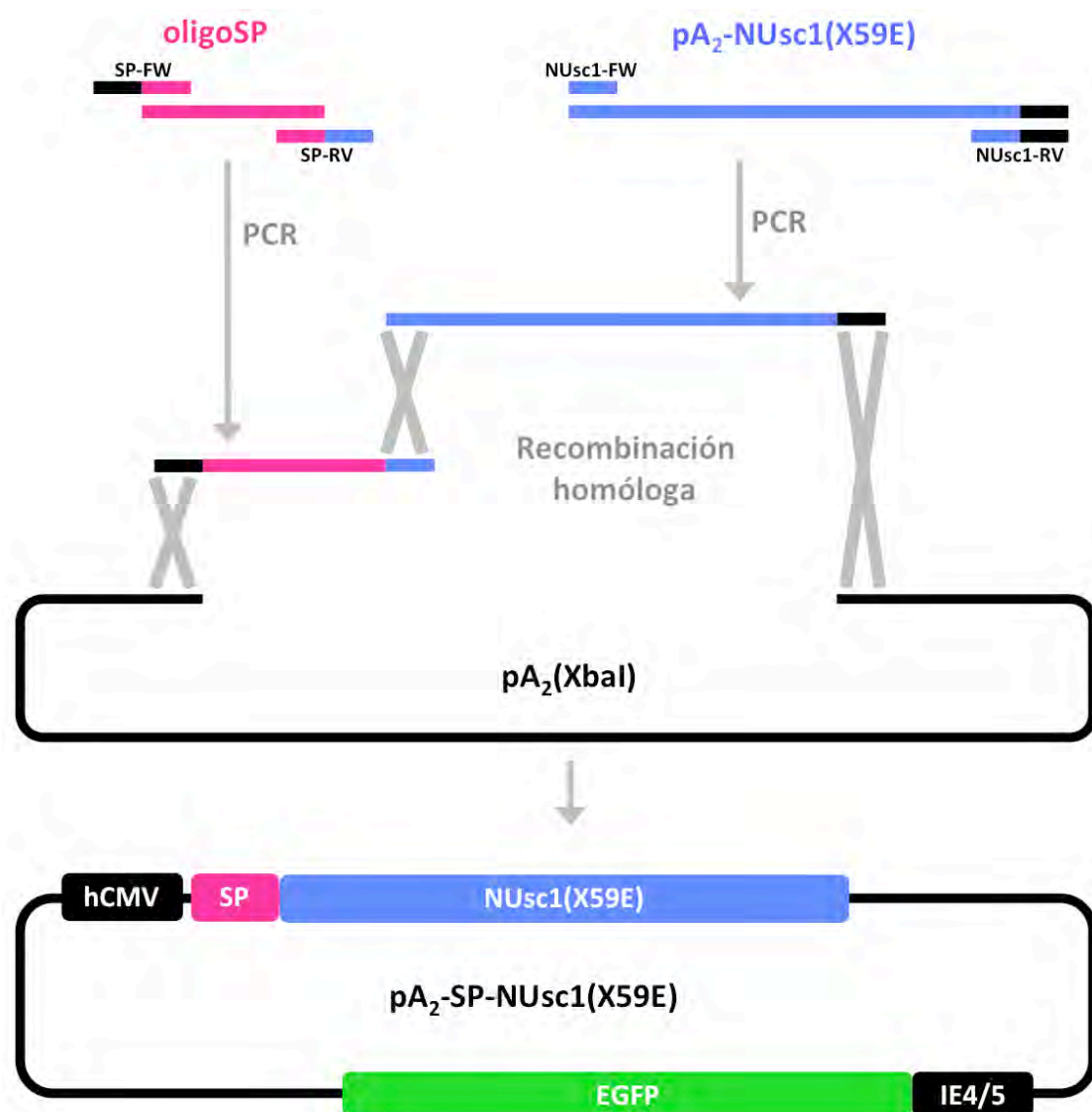


## ANEXO: DESARROLLO DE VECTORES AMPLICÓN PARA EXPRESAR UN SCFV ESPECÍFICO CONTRA $\alpha\beta$

Para desarrollar vectores virales de tipo amplicón como una posible herramienta para atenuar los efectos deletéreos de los  $\alpha\beta$  *in vivo*, inicialmente construimos el plásmido amplicón pA<sub>2</sub>-NUsc1, conteniendo la secuencia codificante del scFv NUsc1 (Velasco y col., 2012). Al secuenciar los plásmidos (tanto el construido por nosotros como el original provisto por el Dr. S. Ferreira), notamos que el ORF del scFv NUsc1 se encontraba interrumpido por un codón de terminación *amber* (TAG), generando una proteína de tan sólo 58 aminoácidos, cuando la secuencia del scFv NUsc1 completa seguida por los *His-tag* y *Myc-tag* consta de 282 aminoácidos, generando una proteína de 30 kDa. Velasco y col. (2012) expresaron el scFv NUsc1 completo en bacterias *E. coli* TG1 (Velasco y col., 2012). Teniendo en cuenta que ésta es una cepa supresora del codón *amber*, en la que el codón UAG es interpretado como un aminoácido y no como una señal de terminación (Su y col., 2003), esto explicaría la expresión del scFv NUsc1 en bacterias a pesar de la presencia del codón *amber* en medio del ORF.

Para permitir la expresión del scFv NUsc1 completo en células eucariotas no supresoras del codón *amber*, realizamos una mutación puntual en el plásmido pA<sub>2</sub>-NUsc1 para reemplazar el codón *amber* en la posición 59 por un codón para glutamato (GAG), obteniendo el plásmido pA<sub>2</sub>-NUsc1(X59E). Cuando transfectamos células Gli36 con el pA<sub>2</sub>-NUsc1(X59E), sin embargo, no evidenciamos expresión del scFv NUsc1(X59E) (resultados no mostrados). Esto podría deberse a que los scFv, por sus características hidrofóbicas, podrían ser degradados al ser reconocidos como extraños dentro de la célula transfectada. Construimos entonces el plásmido amplicón pA<sub>2</sub>-SP-NUsc1(X59E), conteniendo la secuencia NUsc1(X59E) antecedida por el péptido señal de la pre-pro-tripsina (SP) (Stevenson y col., 1986), bajo control del promotor hCMV, con el fin de expresar el scFv NUsc1(X59E) en el medio extracelular y en la vía de secreción propuesta para los  $\alpha\beta$ , y la secuencia que codifica la proteína reportera EGFP bajo control del promotor viral IE4/5, que permite cuantificar las partículas virales (titulación) e identificar las células infectadas. Este plásmido contiene -como todo plásmido amplicón- el origen de replicación viral y la secuencia pac (módulo amplicón), y secuencias para la selección y la amplificación en bacterias.

La construcción del plásmido pA<sub>2</sub>-SP-NUsc1(X59E) se realizó utilizando el *kit* de recombinación homóloga *In-Fusion HD Cloning* (Clontech). En la **Figura 51** se esquematiza la estrategia de clonado para obtener el plásmido pA<sub>2</sub>-SP-NUsc1(X59E).



**Figura 51. Estrategia de clonado del plásmido pA<sub>2</sub>-SP-NUsc1(X59E).** A partir de un par de oligonucleotidos sintéticos previamente hibridados (SP) se amplificó por PCR un fragmento de 86 pb conteniendo la secuencia de Kozak seguida por el péptido señal de la pre-pro-tripsina. A partir del plásmido pA<sub>2</sub>-NUsc1(X59E) se amplificó por PCR un fragmento de 820 pb conteniendo el scFv NUsc1(X59E). Se realizó la recombinación homóloga de los productos de PCR y el plásmido pA<sub>2</sub> linearizado por digestión con XbaI, para obtener finalmente el plásmido amplicón pA<sub>2</sub>-SP-NUsc1(X59E), conteniendo la secuencia codificante del scFv NUsc1(X59E) antecedida por la secuencia de Kozak y el péptido señal de la pre-pro-tripsina, bajo control del promotor hCMV y la secuencia que codifica la EGFP bajo control del promotor herpético IE4/5. Este plásmido contiene también el módulo amplicón y secuencias bacterianas para su selección y amplificación (no representadas en la figura).

De acuerdo a las instrucciones del fabricante diseñamos *primers* específicos para generar productos de PCR que luego pudieran, recombinación homóloga mediante, formar el plásmido pA<sub>2</sub>-SP-NUsc1(X59E). Por PCR, utilizando *primers* específicos y el programa de termociclado detallados en la **Tabla 5**, a partir del plásmido pA<sub>2</sub>-NUsc1(X59E) amplificamos un fragmento “scFv” de 820 pb conteniendo la secuencia NUsc1(X59E), con el agregado de un

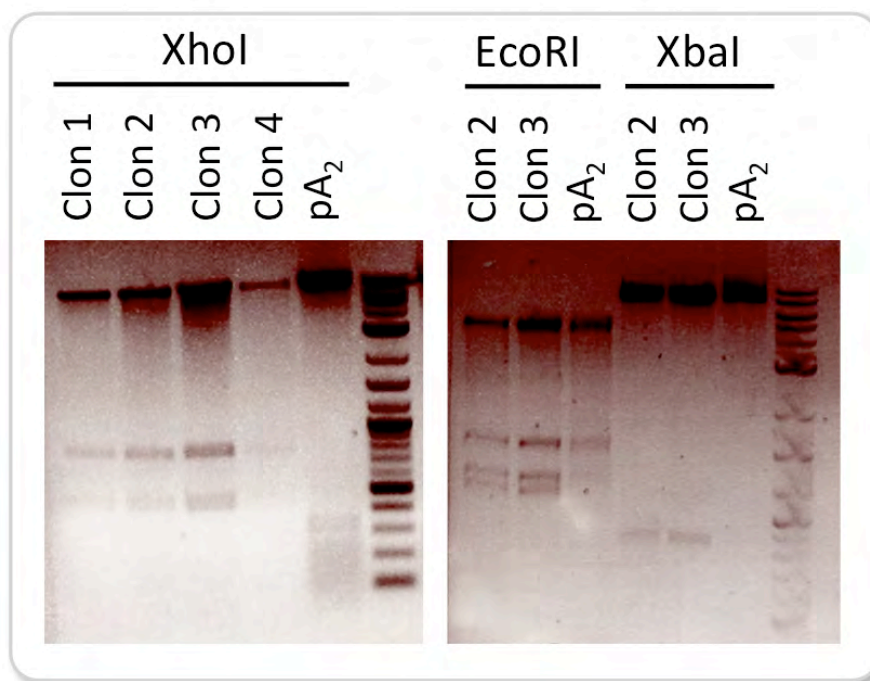
extremo homólogo al plásmido pA<sub>2</sub> en posición 3'. Por otro lado, hibridamos un par de oligonucleótidos sintéticos (oligoSP-FW y oligoSP-RV) como se indica en Materiales y Métodos (sección Hibridación de oligonucleótidos, página 95) y, a partir de este molde y utilizando *primers* específicos, amplificamos por PCR un fragmento "SP" de 86 pb conteniendo la secuencia de Kozak (Kozak, 1989) seguida por una secuencia que codifica el péptido señal de la pre-pro-tripsina (Stevenson y col., 1986) con el agregado de un extremo de 15 pb homólogas al pA<sub>2</sub> en posición 5', y de un extremo de 15 pb homólogas al NUsc1(X59E) -sin el codón de iniciación (ATG)- en posición 3' (**Tabla 5**).

Paso	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	98 °C	30 seg
35 ciclos	98 °C	10 seg
	61 °C	1 min
	72 °C	1 min
Extensión final	72 °C	10 min
	4 °C	indefinidamente

Oligonucleótido	Secuencia
oligoSP-FW	5' - <b>GCACCATGTCGGCCCTGCTGATCCTGGCCCTGGTCGGAGCCGCCGTCGCC</b> -3'
oligoSP-RV	5' - <b>GGCGACGGCGGCTCCGACCAGGGCCAGGATCAGCAGGGCCGACATGGTGC</b> -3'
SP-FW	5' - GCGTGGTACCTCTAG <b>GCACCATGTCGGCCCTGCT</b> -3'
SP-RV	5' - <b>TCCAACAGCTGCACCTCGGC</b> <b>GGCGACGGCGGCTCCGA</b> -3'
NUsc1-FW	5' - <b>GCCGAGGTGCAGCTGTTG</b> -3'
NUsc1-RV	5' - CCGGGTCGACTCTAG <b>ACTATGCGGCCCATTCAGATCC</b> -3'

**Tabla 5. Condiciones de PCR y oligonucleótidos utilizados para el clonado del plásmido pA<sub>2</sub>-SP-NUsc1(X59E).** Se detalla el programa de termociclado (sección superior) y los oligonucleótidos o *primers* específicos utilizados (sección inferior).

El plásmido amplicón pA<sub>2</sub> se digirió con la enzima XbaI y el producto se migró en un gel de agarosa, del cual se extrajo la porción conteniendo la banda a la altura de 7798 pb, para luego purificar el ADN utilizando el *kit* comercial *Nucleospin Extract II* (Macherey-Nagel). Utilizando el *kit* comercial *In-Fusion* (Clontech) se llevó a cabo la recombinación homóloga entre el plásmido pA<sub>2</sub>(XbaI) y los productos de PCR "SP" y "scFv". Con el producto de la recombinación se transformaron bacterias *E. coli* (NEB-5-alfa, NEB) según las indicaciones del proveedor. Luego se realizó la amplificación y la selección tal como se indicó en Materiales y Métodos (sección Estrategia general de clonado, página 92). Los plásmidos obtenidos se analizaron por digestión con las enzimas XhoI, EcoRI y XbaI, y posterior migración electroforética en geles de agarosa. Los resultados se muestran en la **Figura 52**.



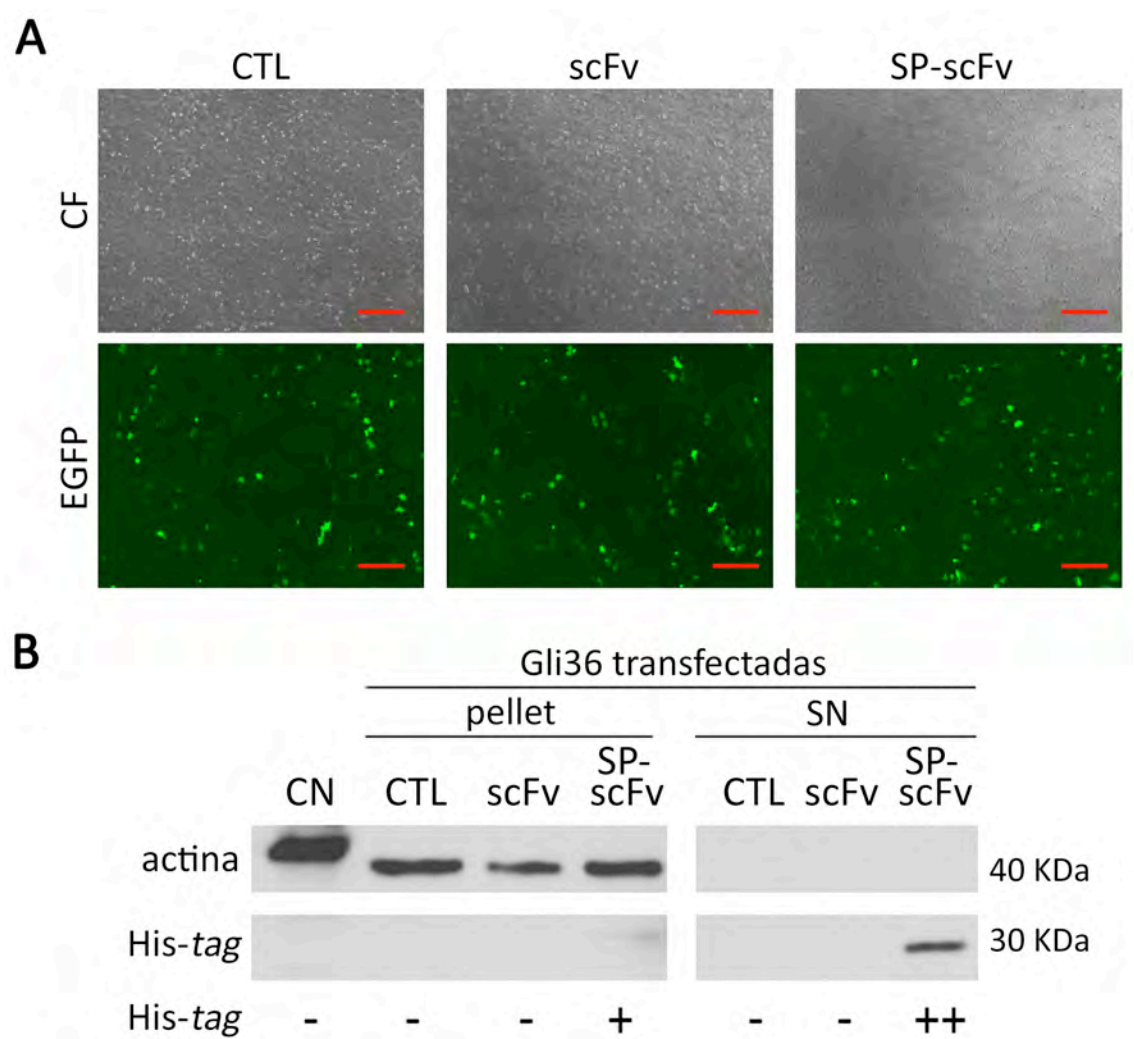
**Figura 52. Migración en gel de agarosa de los fragmentos obtenidos por digestión enzimática de los plásmidos pA<sub>2</sub>-NUsc1(X59E) y pA<sub>2</sub>.** Por digestión con enzimas de restricción se verificaron los clones 1 a 4 y el plásmido pA<sub>2</sub>. Se verificaron los patrones de bandas esperados para las digestiones con las enzimas XhoI y XbaI. Por digestión con la enzima EcoRI se confirmó la presencia de una banda a la altura de 1273 pb, correspondiente a la secuencia de corte/empaquetado, esencial en todo plásmido amplicón. Fragmentos esperados (pb): Digestión con XhoI: pA<sub>2</sub>-SP-NUsc1(X59E), 7413 + 762 + 423; pA<sub>2</sub>, 7413 + 325. Digestión con EcoRI: pA<sub>2</sub>-SP-NUsc1(X59E), 4621 + 1556 + 1274 + 1147; pA<sub>2</sub>, 4621 + 1556 + 1274 + 287. Digestión con XbaI: pA<sub>2</sub>-SP-NUsc1(X59E), 7738 + 860; pA<sub>2</sub>, 7738.

Por digestión enzimática con XhoI, XbaI y EcoRI se verificaron positivamente los clones 2 y 3 para el plásmido amplicón pA<sub>2</sub>-SP-NUsc1(X59E), conteniendo la secuencia codificante del scFv NUsc1(X59E) precedida por el SP bajo control del promotor hCMV, y la secuencia codificante de la proteína reportera EGFP bajo control del promotor IE4/5, el módulo amplicón y las secuencias bacterianas para su selección y amplificación. El clon 2 fue verificado por secuenciación (GATC Biotech) utilizando los *primers* CMV-F 5'-CGCAATGGGC GGTAGGCGTG-3' y T7 5'-TAATACGACTCACT ATAGGG-3' provistos por la empresa.

## VERIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS TRANSGENES DE INTERÉS

Para evaluar la capacidad de los plásmidos amplicón pA<sub>2</sub>-NUsc1(X59E) y pA<sub>2</sub>-SP-NUsc1(X59E) para expresar el scFv NUsc1(X59E), realizamos ensayos de transfección en células Gli36 utilizando el agente transfectante JetPrime (ver Materiales y Métodos, sección Transfección de cultivos, página 96). 48 h post-transfección observamos los cultivos por

microscopía de epifluorescencia y luego recolectamos el sobrenadante (SN) de cada cultivo y lo centrifugamos para eliminar restos celulares. Por otro lado, lavamos las células con PBS y las cosechamos y centrifugamos (*pellet*). Para evaluar la expresión del scFv NUsc1(X59E), de 30 kDa, analizamos las muestras por *Western blot* (ver Capítulo I, Materiales y Métodos, sección *Western blot*, página 31) utilizando un anticuerpo específico contra His-tag. Los resultados se muestran en la **Figura 53**.



**Figura 53. Expresión del scFv NUsc1(X59E) en cultivos transfectados con los plásmidos pA<sub>2</sub>-NUsc1(X59E), pA<sub>2</sub>-SP-NUsc1(X59E) y pA<sub>2</sub>-LacZ.** Se transfectaron células Gli36 con los plásmidos pA<sub>2</sub>-NUsc1(X59E), pA<sub>2</sub>-SP-NUsc1(X59E) y pA<sub>2</sub>-LacZ como control (scFv, SP-scFv y CTL, respectivamente). A las 48 h, los cultivos fueron observados y cosechados (separando pellet y SN). Se analizó la expresión del scFv NUsc1(X59E) mediante *Western blot* **A**. Microfotografías de los cultivos, obtenidas por microscopía de epifluorescencia 48 h post-transfección. **B**. Análisis de la expresión del scFv NUsc1(X59E) de 30 KDa por *Western blot* utilizando un anticuerpo específico contra His-tag y un anticuerpo específico contra actina (control de carga), en *pellet* y SN de los cultivos transfectados. CN: extracto de células HeLa no transfectadas, como control negativo. Barra de escala: 200  $\mu$ m.

Como se muestra en la **Figura 53**, se verificó la expresión del scFv NUsc1(X59E) en SN de células transfectadas con el plásmido pA<sub>2</sub>-SP-NUsc1(X59E), con expresión débil en el *pellet*. No se detectó expresión del scFv NUsc1(X59E) en células transfectadas con los plásmidos pA<sub>2</sub>-SP-NUsc1(X59E) y pA<sub>2</sub>-LacZ.

## **PRODUCCIÓN DE VECTORES AMPLICÓN**

Se realizó una producción de vectores amplicón a partir del plásmido pA<sub>2</sub>-SP-NUsc1(X59E) y se obtuvo un título de 10<sup>9</sup> UT/ml y contaminación con virus auxiliar del 30%. Dada la alta contaminación con virus auxiliar, la producción no fue apta para iniciar los ensayos funcionales. Se requerirán nuevas etapas de amplificación y/o purificación para mejorar la calidad de la producción de vectores A<sub>2</sub>-SP-NUsc1(X59E).

## DISCUSIÓN

---





## DESARROLLO DE VECTORES AMPLICÓN PARA MODIFICAR LA EXPRESIÓN DE SUBUNIDADES REGULATORIAS DEL RNMDA

Con el fin de estudiar el rol de las subunidades regulatorias del RNMDA en los procesos de aprendizaje y memoria, nos propusimos desarrollar vectores virales de tipo amplicón capaces de modificar la expresión de las subunidades GluN2A y GluN2B, que son las predominantes en el hipocampo. La dificultad para realizar estudios farmacológicos reside en la falta de agentes suficientemente selectivos; existe información controvertida acerca de los roles de las subunidades regulatorias, tanto en plasticidad sináptica como en aprendizaje y memoria, aún habiéndose desarrollado algunos estudios relevantes por manipulación genética (Bannerman y col., 2008; Brigman y col., 2010; Jacobs y Tsien, 2012; Tang y col., 1999; von Engelhardt y col., 2008). Nos propusimos entonces desarrollar vectores amplicón conteniendo las secuencias codificantes de las subunidades GluN2A y GluN2B, en orientación sentido para expresar dichas subunidades, y en orientación antisentido, para disminuir su expresión por interferencia por ARN.

Inicialmente construimos plásmidos amplicón conteniendo las secuencias codificantes de cada una de las subunidades, pero no lográbamos obtener clones positivos para ninguno de los plásmidos. Aunque el promotor hCMV es un promotor de eucariotas, se ha demostrado que es capaz de iniciar la expresión de secuencias en células procariotas (Goussard y col., 2003; Lewin y col., 2005). Si éste fuera el caso, tal vez la expresión de las subunidades GluN2A y GluN2B podría ser tóxica y/o letal para las bacterias, razón por la cual no logramos obtener clones para los plásmidos con secuencias para las subunidades GluN2A y GluN2B. A diferencia de las células eucariotas, las procariotas carecen del mecanismo de *splicing*. Para evitar la expresión de las subunidades en bacterias, insertamos un intrón intercalado en el ORF de cada una de las subunidades, obteniendo el plásmido amplicón pA<sub>2</sub>-2A(S), conteniendo una secuencia que codifica la subunidad GluN2A -con intrón intercalado-, bajo el control del promotor hCMV, y el plásmido amplicón pA<sub>2</sub>-2B(S), conteniendo una secuencia que codifica la subunidad GluN2B -con intrón intercalado-, bajo el control del mismo promotor hCMV. En células transfectadas con los plásmidos pA<sub>2</sub>-2A(S) y pA<sub>2</sub>-2B(S), demostramos su eficiencia para expresar las subunidades GluN2A y GluN2B, respectivamente. A partir de estos plásmidos construimos los vectores amplicón 2A(S) y 2B(S), obteniendo títulos de alrededor de 10<sup>8</sup> UT/ml, con una contaminación con virus auxiliar de alrededor del 5%, apropiados para su uso *in vitro* e *in vivo*.

Construimos plásmidos conteniendo las secuencias codificantes de las subunidades GluN2A y GluN2B -con intrón intercalado-, en orientación antisentido, bajo control del promotor hCMV.

Por transfección en líneas celulares demostramos la eficiencia del plásmido pA<sub>2</sub>-2B(AS) para disminuir la expresión de la subunidad GluN2B, tanto de ratón como de rata. A partir de los plásmidos pA<sub>2</sub>-2A(AS) y pA<sub>2</sub>-2B(AS), construimos los vectores amplicón 2A(AS) y 2B(AS), obteniendo títulos y niveles de contaminación con virus auxiliar similares y apropiados para su uso *in vitro* e *in vivo*. En cultivos primarios, demostramos que la infección con vectores 2A(AS) produjo una disminución significativa en la expresión de la subunidad GluN2A. En el caso del vector 2B(AS), los resultados sugieren fuertemente que sería efectivo para disminuir la expresión de GluN2B.

En ensayos *in vivo*, por inoculación intra-hipocampo de los vectores 2A(AS) y 2B(AS), los resultados obtenidos por *Western blot* no evidenciaron disminución de la expresión de las subunidades GluN2A ni GluN2B. Resultados previos de nuestro laboratorio demuestran que, *in vivo*, unas pocas células (por ejemplo, 6-7 % de la región CA1) resultan infectadas por infusión intrahipocampo de los vectores (Cheli y col., 2006), por lo que sabemos que es muy difícil detectar una posible disminución de las proteínas en el total de la estructura o aún, en una porción de tejido en la zona de inoculación. Pero el KD de la subunidad GluN1 obligatoria (y por lo tanto del RNMDA) aún en esa pequeña proporción de neuronas fue suficiente para alterar el aprendizaje y la memoria. En base a esos resultados previos y a los resultados *in vitro* aquí presentados, interpretamos que, de haber un KD de las subunidades GluN2A y GluN2B en unas pocas células infectadas *in vivo*, la gran cantidad de células no infectadas (mucho mayor que la de las células infectadas), expresando normalmente las subunidades, impediría revelar la disminución. Para poder evaluar los niveles de expresión de cada subunidad en las células deberán realizarse, en un futuro, ensayos de inmunohistoquímica en cortes de cerebro. Lamentablemente, ninguno de los anticuerpos ensayados, que fueron útiles para los ensayos de *Western blot* y de inmunocitoquímica en cultivos primarios, resultó apropiado para la inmunohistoquímica de cortes de cerebro. Entonces, por el momento tuvimos que basarnos en los ensayos *in vitro* para poder interpretar, de manera preliminar, los resultados de los ensayos *in vivo* con los mismos vectores.

## FORMACIÓN DE MEMORIAS EN ANIMALES INOCULADOS CON VECTORES AS CONTRA GLUN2A Y GLUN2B

Los animales inoculados intra-hipocampo con vectores 2A(AS) evidenciaron MT y MLP, tanto en el CA como en EI. Estos resultados indican que la inoculación de vectores 2A(AS) no tuvo efecto deletéreo sobre la formación de una memoria de habituación sencilla, con componentes espaciales, ni sobre una memoria asociativa con componentes aversivos. Sin embargo, se ha reportado que ratones con KO de la subunidad GluN2A o de su dominio C-terminal intracelular, presentaron deterioro en la MT espacial y disminución de la preferencia por la novedad, pero no presentaron alteraciones en la memoria de referencia espacial (Bannerman y col., 2008). Por otra parte, fue propuesto que se requiere la pérdida combinada de GluN2B y GluN2A (o GluN1 *per se*) en CA1, para producir déficits de memoria en algunas tareas de aprendizaje espacial (Brigman y col., 2010). Entonces, pareciera que los efectos sobre el aprendizaje y la memoria producidos por el KD de GluN2A en el hipocampo son sutiles y difíciles de discriminar, sugiriendo que no tendría un papel determinante en la adquisición de diversas memorias –incluyendo algunas con componentes espaciales o aversivos–.

Algunos animales inoculados intra-hipocampo con vectores 2B(AS) se habituaron al CA dentro de la sesión de 5 min, pero a diferencia de los inoculados con vectores CTL y 2A(AS), los parámetros exploratorios disminuyeron menos y más tardíamente, sólo hacia el final de la sesión. Es decir que, aunque algunos animales con vectores 2B(AS) expresaron MT, tuvieron un peor desempeño que las ratas de los otros dos grupos. Por otra parte, no evidenciaron MLP, ni en la tarea de CA ni en la tarea de EI.

Aunque los vectores 2A(AS) y 2B(AS) demostraron ser efectivos para producir la disminución *in vitro* de cada una de las subunidades, GluN2A y GluN2B respectivamente, no se pudo verificar su efectividad *in vivo*; aunque es posible que la disminución haya sido efectiva también *in vivo* y, sin embargo, no hayamos podido detectarla, como ya se discutió.

Ha sido reportada facilitación de la inducción de la LTP en rodajas de hipocampo y una mejor MLP espacial en ratones transgénicos sobre-expresando GluN2B (Tang y col., 1999). Sin embargo, Guscott y col. (2003) no observaron alteraciones en el aprendizaje ni en la consolidación de memorias espaciales, cuando evaluaron el desempeño de ratas en el LAM, luego de antagonismo farmacológico “selectivo” de los RNMDA-GluN2B (Guscott y col., 2003). Por otro lado, Ge y col. (2010) demostraron que el bloqueo de GluN2B inhibía la LTD, alterando

la memoria espacial en ratas, sugiriendo un rol crucial de la LTD mediada por RNMDA-GluN2B en la consolidación de memorias, mientras que, con dicho bloqueo, no se observaron alteraciones en la LTP (Ge y col., 2010). Estos últimos trabajos, así como nuestros resultados comportamentales, concuerdan con aquellos obtenidos con ratones mutantes con delección de GluN2B en la región CA1 de hipocampo y en neuronas piramidales corticales (Brigman y col., 2010); en esos animales se inhibió la LTD, hubo una deficiencia parcial en la LTP (incremento del umbral) y déficits cognitivos profundos, que se manifestaron en tareas dependientes de hipocampo. Por otra parte, en un análisis con otras tareas, se vió que la delección de GluN2B en células de CA1 y en células granulares del giro dentado, alteró algunos aprendizajes dependientes de hipocampo (reversión espacial y MT), pero no todos (referencia espacial) (von Engelhardt y col., 2008). Ratones Tg sobre-expresando GluN2B mostraron mejor desempeño en el reconocimiento de animales de cepas diferentes o de animales de otras especies, que llevaron a interpretar que la sobre-expresión de GluN2B en el telencéfalo mejoraría la memoria de reconocimiento social (Jacobs y Tsien, 2012).

En nuestro laboratorio demostramos que el bloqueo farmacológico de RNMDA-GluN2B, con el antagonista relativamente selectivo ifenprodil, luego de una sesión de entrenamiento en EI con un estímulo sub-umbral, así como luego de una sesión de entrenamiento en la tarea de LO, facilitó la consolidación de las MLP de esas tareas (Cercato y col., 2014). Sin embargo, el posible KD de la subunidad GluN2B con el vector respectivo habría impedido la formación de MLP del CA y de la EI, como aquí se reportó; es decir que los RNMDA-GluN2B podrían ser requeridos para la adquisición de estas memorias. Una interpretación plausible sería que estos receptores tendrían un rol inhibitorio durante la consolidación de la memoria, mientras que su actividad sería requerida durante el aprendizaje.

## **ANEXO: DESARROLLO DE VECTORES AMPLICÓN PARA EXPRESAR UN SCFV ESPECÍFICO CONTRA $\alpha\beta$ A**

La EA, principal causa de demencia en ancianos, se caracteriza por acumulación anormal del péptido  $\beta$ A en el cerebro. Existen numerosas evidencias que indican que los  $\alpha\beta$ A (y no necesariamente las fibras insolubles, que también se originan por agregación del  $\beta$ A) serían las principales neurotoxinas responsables de la disfunción sináptica y la pérdida de la capacidad de formar memorias en las fases iniciales de la EA (Ferreira y Klein, 2011; Ferreira y

col., 2007). En consecuencia, la interacción entre  $\alpha\beta$ A y neuronas es un blanco estratégico para el desarrollo de nuevas formas de intervención terapéutica.

Cuando se demostró que el KD de GluN1 inhibía completamente la unión de  $\alpha\beta$ A a las neuronas y suprimía la producción de ROS, inducida por los oligómeros en esas células, pensamos que un posible blanco para evitar dicha unión podría ser alguna de las subunidades regulatorias del RNMDA. Se reportó que la unión ocurriría preferencialmente a nivel del RNMDA-GluN2B (Ferreira y col., 2012). Paralelamente demostramos que el bloqueo farmacológico de esos receptores en el hipocampo, facilitaba la consolidación de algunas memorias (Cercato y col., 2014).

Desarrollamos un vector AS contra esa subunidad y comenzamos a estudiar el rol de la misma en adquisición y consolidación de memorias. Los resultados obtenidos muestran la importancia de dicha subunidad del hipocampo en los procesos de adquisición de memorias dependientes de esa estructura. Por lo tanto, la posibilidad de utilizar antagonistas o ARN AS contra la subunidad regulatoria GluN2B no parece un camino factible para una terapia experimental temprana.

Como se mencionara en el Capítulo I (Discusión, página 67), se sabe que en cultivos maduros de neuronas (22-30 DIV) la actividad de los RNMDA reprime la traducción de GluN2B, mientras que el bloqueo prolongado de los RNMDA libera dicha represión (Chen y Bear, 2007). Así, la activación exagerada de los RNMDA-GluN2B por los “ligandos con ganancia de función”  $\alpha\beta$ A, podría reprimir la expresión de nuevos RNMDA-GluN2B en las sinapsis, llevando a un aumento de la relación GluN2A/GluN2B. Una actividad exagerada de los RNMDA sería excitotóxica y, aunque en conjunto los resultados obtenidos y los datos de la bibliografía permiten especular que la actividad en las sinapsis excitatorias protegería a las neuronas y circuitos involucrados, un aumento exagerado de GluN2A –como ocurre en las ratas Tg de 1 año– y una disminución significativa concomitante de GluN2B, podría restringir la plasticidad sináptica subyacente al aprendizaje y la memoria.

La inhibición directa de la producción del  $\beta$ A como medio para reducir los  $\alpha\beta$ A tóxicos *in vivo*, ha resultado una estrategia arriesgada y compleja, ya que esta molécula cumpliría funciones fisiológicas importantes (Giuffrida y col., 2009; Puzzo y col., 2008). Estimular los mecanismos de depuración, especialmente por inmunoterapia anti- $\beta$ A, se presentó entonces como una estrategia terapéutica atractiva. Algunos candidatos basados en esta estrategia ya fueron o están siendo sometidos a ensayos clínicos. Inicialmente, un ensayo usando como

vacuna el mismo péptido  $\beta$ A, dio lugar a una producción significativa de anticuerpos anti- $\beta$ A, pero la ocurrencia de meningoencefalitis en un 6% de los pacientes sometidos al tratamiento, posiblemente inducida por la respuesta inmune mediada por células T, llevó a cancelar los ensayos (Orgogozo y col., 2003). Resultados alentadores con inmunización pasiva con anticuerpos anti- $\beta$ A inyectados sistémicamente o intra-cerebro, abrieron el camino para ensayos clínicos usando esas moléculas. Esos anticuerpos anti- $\beta$ A fueron capaces de bloquear, e incluso revertir, la toxicidad asociada al  $\beta$ A, tanto *in vitro* como *in vivo* en modelos animales (Dodart y col., 2002; Klyubin y col., 2008; Kotilinek y col., 2002). Sin embargo, todas las IgGs anti- $\beta$ A sometidas a ensayos clínicos hasta el momento, fallaron en producir alguna mejoría cognitiva significativa en los pacientes, a diferencia de lo que se observó en modelos animales. Una posible explicación para esta paradoja es que los anticuerpos anti- $\beta$ A ensayados no son sensibles a conformación, es decir, que reconocen el  $\beta$ A en todas las conformaciones, incluyendo monómeros y fibras, lo que reduciría significativamente los niveles de anticuerpo libre para interactuar con los o $\beta$ A en los tejidos blanco. Otros factores relevantes que pueden haber afectado el desarrollo de los ensayos clínicos usando IgG anti- $\beta$ A, son la inducción de respuesta inflamatoria indeseable por intermedio de la porción no variable –Fc– del anticuerpo (Wilcock y col., 2004) y la baja permeabilidad a las IgG de la barrera hemato-encefálica, dado su alto peso molecular (Pardridge, 2009). La inmunización pasiva con scFv específicos anti-o $\beta$ A podría constituir una solución terapéutica para etapas tempranas de la EA, con la selectividad necesaria y sin la inflamación indeseable; pero aún resta solucionar la accesibilidad al sitio donde sería necesaria su acción y su disponibilidad biológica.

Lambert y col. (2007) desarrollaron y caracterizaron un anticuerpo monoclonal NU1, que reconoce oligómeros aislados de tejidos de pacientes con EA y bloquea la unión a neuronas de o $\beta$ A, tanto los derivados de pacientes humanos como los de péptidos sintéticos; con preferencia por o $\beta$ A sintéticos de alto peso molecular (mayor a 50 kDa). Este anticuerpo reconoce epitopes dependientes de la estructura terciaria formada por la auto-asociación de  $\beta$ A1-42, no reconoce  $\beta$ A1-40 y muestra una afinidad mínima por  $\beta$ A1-42 monomérico (Lambert y col., 2007). El grupo de Sergio Ferreira desarrolló un scFv NUsc1 y se verificó la efectividad de este scFv para unir específicamente una pequeña fracción de o $\beta$ A de alto peso molecular (de más de 50 kDa), incluyendo aquellos capaces de unirse a las sinapsis (Velasco y col., 2012), sentando las bases para el desarrollo de una prometedora herramienta terapéutica contra la EA.

Una de las dificultades a resolver para encarar esta posible terapia experimental contra la EA, es que la acción del scFv sería requerida en el lugar donde se generan/acumulan los o $\beta$ A, es decir, intracerebralmente. Se ha sugerido que los o $\beta$ A empiezan a formarse dentro de las neuronas y así, sus primeros efectos deletéreos podrían desencadenarse intracelularmente (Cuello y col., 2012; Figueiredo y col., 2013). Por otro lado, junto con el grupo de Sergio Ferreira, nuestro grupo demostró que la ganancia de función del RNMDA estaría mediada por unión de los o $\beta$ A –presentes en el espacio extracelular– al mismo receptor o a su entorno (Decker y col., 2010). Luego, Ferreira y col. (2012) reportaron que la unión sería preferencialmente a los RNMDA-GluN2B; aunque es posible que algunos efectos deletéreos más precoces se desencadenen también por interacción de los o $\beta$ A con diversas maquinarias proteicas a nivel intracelular (motores, citoesqueleto, sistemas de degradación) (Ferreira y col., 2012).

En base a estos antecedentes, en colaboración con Sergio Ferreira (UFRJ, Brasil) y Alberto Epstein (CNRS y Univ. Lyon-1, Francia), nos propusimos desarrollar vectores amplicón para expresar un scFv NUsc1 específico contra o $\beta$ A, como una posible herramienta terapéutica experimental contra la EA.

Para el desarrollo de los vectores, en un principio, planteamos la construcción de un plásmido amplicón conteniendo la secuencia codificante del scFv NUsc1 (Velasco y col., 2012), con el objetivo de expresar dicho scFv intracelularmente. La secuencia que codifica el scFv NUsc1 incluye un codón que es interpretado como un aminoácido en bacterias supresoras del codón *amber* (Su y col., 2003), como lo son las *E. Coli* TG1 utilizadas por el grupo de Sergio Ferreira. Pero en células eucariotas, ese codón es interpretado como una señal de terminación. Por ello, en células eucariotas la secuencia NUsc1 generaría una proteína truncada. Para poder expresar el scFv NUsc1 en células eucariotas, realizamos una mutación puntual (X59E) en la secuencia que codifica el scFv NUsc1, reemplazando el codón *amber* por un codón que codifica glutamato, obteniendo el plásmido amplicón pA<sub>2</sub>-NUsc1(X59E) conteniendo la secuencia NUsc1(X59E). En células transfectadas con el plásmido pA<sub>2</sub>-NUsc1(X59E), sin embargo, no logramos evidenciar expresión del scFv NUsc1(X59E). Debido a la naturaleza hidrofóbica de los scFvs, éstos podrían ser degradados intracelularmente; y ésta podría ser la causa por la que no detectamos expresión del scFv NUsc1(X59E) en las células transfectadas. Para lograr una expresión ligada a membranas, “protegida” y que permitiera la secreción del scFv, construimos el plásmido pA<sub>2</sub>-SP-NUsc1(X59E), insertando la secuencia que codifica el péptido señal de la pre-pro-tripsina río arriba del scFv NUsc1(X59E).

Mediante *Western blot*, utilizando un anticuerpo específico contra el *tag* de histidina – codificado río abajo del scFv NUsc1(X59E)–, verificamos expresión del scFv NUsc1(X59E) en el SN de cultivos de células eucariotas transfectadas con el plásmido pA<sub>2</sub>-SP-NUsc1(X59E) (con marca tenue en el *pellet* celular), lo que indica que el scFv fue exportado.

Hasta el momento de presentar esta Tesis, se han producido vectores amplicón a partir del plásmido pA<sub>2</sub>-SP-NUsc1(X59E), con un título de 10<sup>9</sup> UT/ml, pero aún con contaminación elevada (30%) con virus auxiliar. Esperamos que la infección de neuronas en cultivo con el vector A<sub>2</sub>-SP-NUsc1(X59E) permita que se exporte una concentración significativa del scFv, de manera que pueda ejercer su función neutralizando a los oβA fuera de las células, evitando que éstos se unan a la membrana neuronal (particularmente a las sinapsis) y desencadenen los consecuentes efectos deletéreos en las neuronas (Decker y col., 2010). También sería esperable que el scFv actuara en la vía de secreción, donde está postulado que serían producidos los oβA, al menos en parte (ver Sisodia y St George-Hyslop, 2002). En un futuro próximo se podría desarrollar un vector que contuviera una señal de localización vacuolar o de membrana, para direccionar la acción del scFv NUsc1(X59E) hacia destinos intracelulares.



# **RESUMEN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES**

---



# ESTUDIO DE POSIBLES CAMBIOS EN LOS NIVELES DE LAS SUBUNIDADES DEL RNMDA EN PROCESOS RELACIONADOS CON EL APRENDIZAJE Y LA MEMORIA

## RESUMEN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS Y CONCLUSIONES

Estudiamos la habituación a un ambiente novedoso en animales de genotipo salvaje (Controles) y en un modelo de EA, contemplando dos grupos etéreos: animales adultos jóvenes y de 1 año de edad. Mediante la exposición a un CA y la cuantificación de los parámetros exploratorios (cruzamientos y elevaciones), evaluamos memorias dependientes de hipocampo, estructura que se encuentra afectada tempranamente en la EA. Estudiamos la MT exponiendo los animales a una sesión de CA, y la MLP exponiéndolos a dos sesiones de CA separadas por 24 h.

- Corroboramos que:
  - En ratas Controles, tanto adultas jóvenes como de 1 año, hubo MT y formación de MLP.
  - Una sesión de CA de 5 min de duración, pero no de 1 min, fue suficiente para que los animales Controles evidenciaran MLP.
- Demostramos que:
  - También hubo MT en animales Tg adultos jóvenes expuestos por 5 min al CA, sin diferencias entre Controles y Tg en el desempeño.
  - Hubo MT y MLP también en Tg de 1 año, pero hubo diferencias significativas con los Controles en el desempeño en el CA, ya que los parámetros exploratorios totales fueron menores en los Tg.
- Estudiamos los niveles de las subunidades GluN1, GluN2A y GluN2B del RNMDA en hipocampo de animales Controles y Tg, adultos jóvenes y de 1 año edad, a diferentes tiempos luego de la exposición al CA, mediante ensayos de *Western blot*.
  - En Controles adultos jóvenes hubo aumento de las subunidades GluN1 y GluN2A 70 min luego de habituación al CA, sin cambios en los niveles de GluN2B; pero no hubo cambios significativos en los niveles 70 min luego de una sesión de 1 min de duración, siendo similares a los valores obtenidos inmediatamente después de

una sesión (estos niveles en C0 fueron indistinguibles de los valores “basales”, por eso los consideramos como tales).

- En Controles adultos jóvenes, a las 24 h de una sesión en CA, los niveles de GluN1 y GluN2A fueron similares a los “basales”, mostrando la transitoriedad de los cambios.
- En Tg adultos jóvenes hubo una marcada tendencia de aumento de las subunidades GluN1 y GluN2A 70 min luego de una sesión de habituación al CA.
- En cambio, en animales de 1 año tanto Controles como Tg, los niveles de GluN1 y GluN2A, fueron indistinguibles de los niveles “basales” a los 70 min de una y de dos sesiones en CA, aún cuando estos animales habían aprendido y recordado, lo que sugiere fuertemente que los cambios en las subunidades no serían requeridos para la formación de esas memorias.
- En todos los grupos de animales Tg de 1 año, los niveles de GluN2A fueron mayores que en Controles de 1 año, indicando una regulación diferente o una desregulación en las subunidades del RNMDA.

Investigamos la localización celular de los cambios detectados a los 70 min de la habituación en un modelo *in vitro*, en el que previamente se han observado cambios símil-LTP. Para ello, expusimos cultivos de neuronas de hipocampo a pulsos de KCl repetidos y analizamos por inmunofluorescencia los niveles de las subunidades GluN1, GluN2A y GluN2B en “dendritas” y en cuerpos neuronales, a distintos tiempos luego de la estimulación.

- 30 min luego de la estimulación, hubo aumento de los puntos de GluN1 y GluN2A en las “dendritas”, sin modificación en la inmunofluorescencia total, sugiriendo que hubo un cambio de localización.
- 70 min después de la estimulación, hubo aumento de GluN1 y GluN2A en puntos en las “dendritas” y también en la inmunofluorescencia total, indicando que hubo un cambio en la regulación, con aumento neto de las proteínas (por incremento de su síntesis, como se demostró luego).
- Los aumentos *in vitro* están en concordancia con los observados *in vivo* en animales adultos jóvenes luego de aprendizaje.

Los incrementos transitorios en GluN1 y GluN2A, observados en animales jóvenes, podrían estar relacionados con el establecimiento/persistencia de la plasticidad sináptica, aunque nuestros resultados sugieren que el cambio no sería requerido para establecer la MLP.

Un incremento en la relación GluN2A/GluN2B podría ser una consecuencia adaptativa compensatoria/homeostática, una vez que la sinapsis sufre algún cambio plástico, disminuyendo la probabilidad de plasticidad sináptica posterior y, tal vez, protegiendo el cambio plástico ocurrido. Estos mecanismos podrían estar alterados en edades avanzadas, tal vez por una regulación diferente o una desregulación de la expresión del RNMDA y de GluN2A en particular.

## **DESARROLLO DE VECTORES VIRALES DE TIPO AMPLICÓN PARA MODIFICAR LA EXPRESIÓN DE GLUN2A Y GLUN2B**

Desarrollamos vectores de tipo amplicón capaces de modificar la expresión de las subunidades GluN2A y GluN2B *in vitro*.

- Construimos los plásmidos pA<sub>2</sub>-2A(S) y pA<sub>2</sub>-2B(S) conteniendo, respectivamente, las secuencias codificantes de las subunidades GluN2A y GluN2B con ORF interrumpidos por un intrón para evitar la expresión en bacterias. Verificamos la expresión de las subunidades GluN2A y GluNB en líneas celulares transfectadas con los plásmidos.
- Construimos los plásmidos pA<sub>2</sub>-2A(AS) y pA<sub>2</sub>-2B(AS) conteniendo secuencias AS contra las subunidades GluN2A y GluN2B respectivamente, interrumpidas con un intrón para evitar la expresión en bacterias. En cultivos transfectados con el plásmido pA<sub>2</sub>-2B(AS), verificamos su efectividad para producir un KD de la expresión de GluN2B.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> La efectividad para producir un KD de la subunidad GluN2A a través de la expresión del AS contra GluN2A, fue evaluada directamente por infección de cultivos de neuronas con vectores amplicón producidos a partir del plásmido pA<sub>2</sub>-2A(AS).

- A partir de los plásmidos contruidos, realizamos producciones de vectores, con alto título y baja contaminación con virus auxiliar, aptas para su uso *in vitro* e *in vivo*. Los resultados sugieren que el vector 2B(AS) fue efectivo para producir un KD de GluN2B en cultivos primarios de neuronas de hipocampo infectados con dicho vector, y verifican la efectividad de los vectores 2A(AS) para producir un KD de GluN2A en cultivos primarios de neuronas.

En suma, construimos esos vectores con éxito, logrando los objetivos propuestos, siendo aptos para utilizarlos *in vivo*.

- Evaluamos el desempeño en CA y en EI de ratas inoculadas en el hipocampo con vectores 2A(AS) o 2B(AS). Las ratas inoculadas con vectores 2A(AS) o con un vector control, expresaron MT y MLP. En las ratas inoculadas con vectores 2B(AS) hubo MT, aunque más tardía y deficiente que en los otros grupos, y esos animales no formaron MLP de esas tareas.

En conjunto, estos resultados sugieren que una disponibilidad plena de GluN2A en el hipocampo no sería necesaria para adquirir y/o consolidar estas memorias; mientras que GluN2B sería requerida posiblemente para la adquisición de esas memorias (ya que otros ensayos de nuestro laboratorio mostraron un rol diferente de los RNMDA-GluN2B durante la consolidación).

## **DESARROLLO DE UNA HERRAMIENTA PARA NEUTRALIZAR LOS $\alpha\beta$ *IN VIVO* COMO POSIBLE TERAPIA EXPERIMENTAL CONTRA LA EA.**

- Construimos el plásmido pA<sub>2</sub>-SP-NUsc1(X59E) conteniendo, bajo control del promotor hCMV, el péptido señal de pre-pro-tripsina, seguido por la secuencia para el scFv NUsc1, con una mutación puntual (X59E) para posibilitar su expresión en células eucariotas.
- Verificamos una abundante expresión del scFv NUsc1, en el sobrenadante de cultivos celulares transfectados con el plásmido pA<sub>2</sub>-SP-NUsc1(X59E), y una expresión mucho menor en el *pellet*.

- Hasta el presente hemos producido vectores amplicón a partir del plásmido pA<sub>2</sub>-SP-NUsc1(X59E) con alto título ( $10^9$  UT/ml) pero con una contaminación con virus auxiliar del 30%, que limita el uso de estos vectores.

En conclusión, construimos un plásmido amplicón que permitió expresar y exportar un scFv específico contra o $\beta$ A en células eucariotas, esperanzándonos en este camino en busca de una posible terapia experimental contra la EA.

*Este trabajo fue financiado por los subsidios de cooperación internacional CNRS-CONICET, MinCyT-ECOS Sud y Laboratorio Internacional Asociado (LIA) DEVENIR (CNRS-CONICET), y por becas y subsidios nacionales otorgados por la ANPCyT, la UBA y el CONICET.*

## REFERENCIAS

- Adrover, M.F., Guyot-Revol, V., Cheli, V.T., Blanco, C., Vidal, R., Alché, L., Kornisiuk, E., Epstein, A.L., Jerusalinsky, D., 2003. Hippocampal infection with HSV-1-derived vectors expressing an NMDAR1 antisense modifies behavior. *Genes. Brain. Behav.* 2, 103–13.
- Adrover, M.F., 2006. Receptores NMDA, hipocampo y memoria. Vectores HSV-1 Amplicón como nuevas herramientas para el estudio de la memoria. FCEN, UBA.
- Akazawa, C., Shigemoto, R., Bessho, Y., Nakanishi, S., Mizuno, N., 1994. Differential expression of five N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNAs in the cerebellum of developing and adult rats. *J. Comp. Neurol.* 347, 150–60.
- Aniksztejn, L., Ben-Ari, Y., 1995. Expression of LTP by AMPA and/or NMDA receptors is determined by the extent of NMDA receptors activation during the tetanus. *J. Neurophysiol.* 74, 2349–57.
- Atkins, C.M., Selcher, J.C., Petraitis, J.J., Trzaskos, J.M., Sweatt, J.D., 1998. The MAPK cascade is required for mammalian associative learning. *Nat. Neurosci.* 1, 602–609.
- Baez, M.V., Oberholzer, M.V., Cercato, M.C., Snitcofsky, M., Aguirre, A.I., Jerusalinsky, D.A., 2013. NMDA receptor subunits in the adult rat hippocampus undergo similar changes after 5 minutes in an open field and after LTP induction. *PLoS One* 8, e55244.
- Bailey, C.H., Kaang, B.K., Chen, M., Martin, K.C., Lim, C.S., Casadio, A., Kandel, E.R., 1997. Mutation in the phosphorylation sites of MAP kinase blocks learning- related internalization of apCAM in *Aplysia* sensory neurons. *Neuron* 18, 913–924.
- Bannerman, D.M., Niewoehner, B., Lyon, L., Romberg, C., Schmitt, W.B., Taylor, A., Sanderson, D.J., Cottam, J., Sprengel, R., Seeburg, P.H., Köhr, G., Rawlins, J.N.P., 2008. NMDA receptor subunit NR2A is required for rapidly acquired spatial working memory but not incremental spatial reference memory. *J. Neurosci.* 28, 3623–30.
- Barria, A., Malinow, R., 2002. Subunit-specific NMDA receptor trafficking to synapses. *Neuron* 35, 345–53.
- Barth, A.L., Malenka, R.C., 2001. NMDAR EPSC kinetics do not regulate the critical period for LTP at thalamocortical synapses. *Nat. Neurosci.* 4, 235–6.
- Bataille, D., Epstein, A.L., 1995. Herpes simplex virus type 1 replication and recombination. *Biochimie* 77, 787–95.
- Bellone, C., Nicoll, R.A., 2007. Rapid bidirectional switching of synaptic NMDA receptors. *Neuron* 55, 779–85.
- Bi, H., Sze, C., 2002. N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2A and NR2B messenger RNA levels are altered in the hippocampus and entorhinal cortex in Alzheimer's disease. *J. Neurol. Sci.* 200, 11–8.
- Blanc, A.M., Berois, M.B., Tomé, L.M., Epstein, A.L., Arbiza, J.R., 2012. Induction of humoral responses to BHV-1 glycoprotein D expressed by HSV-1 amplicon vectors. *J. Vet. Sci.* 13, 59–65.
- Bliss, T. V., Collingridge, G.L., 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361, 31–9.
- Boehmer, P.E., Lehman, I.R., 1997. Herpes simplex virus DNA replication. *Annu. Rev. Biochem.* 66, 347–84.
- Brambilla, R., Gnesutta, N., Minichiello, L., White, G., Roylance, A.J., Herron, C.E., Ramsey, M., Wolfer, D.P., Cestari, V., Rossi-Arnaud, C., Grant, S.G., Chapman, P.F., Lipp, H.P., Sturani, E., Klein, R., 1997. A role for the Ras signalling pathway in synaptic transmission and long-term memory. *Nature* 390, 281–6.
- Breakefield, X., Kramm, C., Chiocca, E., Pechan, P., 1995. Herpes simplex virus vectors for tumor therapy. En: "The Internet Book of Gene Therapy: Cancer Gene Therapeutics". Editores: Sobol, R.E., Scanlon, K.J. Appleton & Lange, Stamford, CT, pp. 41–56.



- Brewer, G.J., 1995. Serum-free B27/neurobasal medium supports differentiated growth of neurons from the striatum, substantia nigra, septum, cerebral cortex, cerebellum, and dentate gyrus. *J. Neurosci. Res.* 42, 674–83.
- Brewer, G.J., Torricelli, J.R., Evege, E.K., Price, P.J., 1993. Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination. *J. Neurosci. Res.* 35, 567–76.
- Brigman, J.L., Wright, T., Talani, G., Prasad-Mulcare, S., Jinde, S., Seabold, G.K., Mathur, P., Davis, M.I., Bock, R., Gustin, R.M., Colbran, R.J., Alvarez, V.A., Nakazawa, K., Delpire, E., Lovinger, D.M., Holmes, A., 2010. Loss of GluN2B-containing NMDA receptors in CA1 hippocampus and cortex impairs long-term depression, reduces dendritic spine density, and disrupts learning. *J. Neurosci.* 30, 4590–600.
- Brouillette, J., Caillierez, R., Zommer, N., Alves-Pires, C., Benilova, I., Blum, D., De Strooper, B., Buée, L., 2012. Neurotoxicity and memory deficits induced by soluble low-molecular-weight amyloid- $\beta$ 1-42 oligomers are revealed in vivo by using a novel animal model. *J. Neurosci.* 32, 7852–61.
- Burdick, D., Soreghan, B., Kwon, M., Kosmoski, J., Knauer, M., Henschen, A., Yates, J., Cotman, C., Glabe, C., 1992. Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's A4/beta amyloid peptide analogs. *J. Biol. Chem.* 267, 546–554.
- Cao, X., Cui, Z., Feng, R., Tang, Y.-P., Qin, Z., Mei, B., Tsien, J.Z., 2007. Maintenance of superior learning and memory function in NR2B transgenic mice during ageing. *Eur. J. Neurosci.* 25, 1815–22.
- Cercato, M.C., Colettis, N., Snitkofsky, M., Aguirre, A.I., Kornisiuk, E.E., Baez, M.V., Jerusalinsky, D.A., 2014. Hippocampal NMDA receptors and the previous experience effect on memory. *J. Physiol. Paris.* 108(4-6): 263-9.
- Cheli, V., 2006. Rol de los receptores glutamatérgicos ionotrópicos en el procesamiento de la información. FFyB, UBA.
- Cheli, V., Adrover, M., Blanco, C., Ferrari, C., Cornea, A., Pitossi, F., Epstein, a L., Jerusalinsky, D., 2006. Knocking-down the NMDAR1 subunit in a limited amount of neurons in the rat hippocampus impairs learning. *J. Neurochem.* 97 Suppl 1, 68–73.
- Cheli, V., Adrover, M., Blanco, C., Rial Verde, E., Guyot-Revol, V., Vidal, R., Martin, E., Alché, L., Sanchez, G., Acerbo, M., Epstein, A., Jerusalinsky, D., 2002. Gene transfer of NMDAR1 subunit sequences to the rat CNS using herpes simplex virus vectors interfered with habituation. *Cell. Mol. Neurobiol.* 22, 303–14.
- Chen, W.S., Bear, M.F., 2007. Activity-dependent regulation of NR2B translation contributes to metaplasticity in mouse visual cortex. *Neuropharmacology* 52, 200–14.
- Clarke, R.J., Johnson, J.W., 2006. NMDA receptor NR2 subunit dependence of the slow component of magnesium unblock. *J. Neurosci.* 26, 5825–34.
- Clayton, D.A., Mesches, M.H., Alvarez, E., Bickford, P.C., Browning, M.D., 2002. A hippocampal NR2B deficit can mimic age-related changes in long-term potentiation and spatial learning in the Fischer 344 rat. *J. Neurosci.* 22, 3628–37.
- Colettis, N.C., 2011. Influencia de diversos factores biológicos y experimentales sobre la memoria en la rata: el “valor de la experiencia previa”; rol de los receptores muscarínicos y NMDA del hipocampo. FCEN, UBA. UBA.
- Colettis, N.C., Snitkofsky, M., Kornisiuk, E.E., Gonzalez, E.N., Quillfeldt, J. a, Jerusalinsky, D. a, 2014. Amnesia of inhibitory avoidance by scopolamine is overcome by previous open-field exposure. *Learn. Mem.* 21, 634–45.
- Collingridge, G.L., Singer, W., 1990. Excitatory amino acid receptors and synaptic plasticity. *Trends Pharmacol. Sci.* 11, 290–6.

- Costantini, L.C., Jacoby, D.R., Wang, S., Fraefel, C., Breakefield, X.O., Isacson, O., 1999. Gene transfer to the nigrostriatal system by hybrid herpes simplex virus/adeno-associated virus amplicon vectors. *Hum. Gene Ther.* 10, 2481–94.
- Cuchet, D., Ferrera, R., Lomonte, P., Epstein, A.L., 2005. Characterization of antiproliferative and cytotoxic properties of the HSV-1 immediate-early ICP0 protein. *J. Gene Med.* 7, 1187–99.
- Cuchet, D., Potel, C., Thomas, J., Epstein, A.L., 2007. HSV-1 amplicon vectors: a promising and versatile tool for gene delivery. *Expert Opin. Biol. Ther.* 7, 975–95.
- Cuello, a C., Allard, S., Ferretti, M.T., 2012. Evidence for the accumulation of Abeta immunoreactive material in the human brain and in transgenic animal models. *Life Sci.* 91, 1141–7.
- Cui, Z., Feng, R., Jacobs, S., Duan, Y., Wang, H., Cao, X., Tsien, J.Z., 2013. Increased NR2A:NR2B ratio compresses long-term depression range and constrains long-term memory. *Sci. Rep.* 3, 1036.
- Cull-Candy, S.G., Leszkiewicz, D.N., 2004. Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Sci. STKE* 2004, re16.
- Cummings, J.A., Mulkey, R.M., Nicoll, R.A., Malenka, R.C., 1996. Ca<sup>2+</sup> signaling requirements for long-term depression in the hippocampus. *Neuron* 16, 825–33.
- Dalton, G.L., Wu, D.C., Wang, Y.T., Floresco, S.B., Phillips, A.G., 2012. NMDA GluN2A and GluN2B receptors play separate roles in the induction of LTP and LTD in the amygdala and in the acquisition and extinction of conditioned fear. *Neuropharmacology* 62, 797–806.
- De Felice, F.G., Velasco, P.T., Lambert, M.P., Viola, K., Fernandez, S.J., Ferreira, S.T., Klein, W.L., 2007. Abeta oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine. *J. Biol. Chem.* 282, 11590–601.
- De Felice, F.G., Wu, D., Lambert, M.P., Fernandez, S.J., Velasco, P.T., Lacor, P.N., Bigio, E.H., Jerecic, J., Acton, P.J., Shughrue, P.J., Chen-Dodson, E., Kinney, G.G., Klein, W.L., 2008. Alzheimer's disease-type neuronal tau hyperphosphorylation induced by A beta oligomers. *Neurobiol. Aging* 29, 1334–47.
- De Oliveira, A.P., Fraefel, C., 2010. Herpes simplex virus type 1/adeno-associated virus hybrid vectors. *Open Virol. J.* 4, 109–22.
- De Silva, S., Bowers, W.J., 2009. Herpes Virus Amplicon Vectors. *Viruses* 1, 594–629.
- Decker, H., Jürgensen, S., Adrover, M.F., Brito-Moreira, J., Bomfim, T.R., Klein, W.L., Epstein, A.L., De Felice, F.G., Jerusalinsky, D., Ferreira, S.T., 2010. N-methyl-D-aspartate receptors are required for synaptic targeting of Alzheimer's toxic amyloid- $\beta$  peptide oligomers. *J. Neurochem.* 115, 1520–9.
- Decker, H., Lo, K.Y., Unger, S.M., Ferreira, S.T., Silverman, M. a, 2010b. Amyloid-beta peptide oligomers disrupt axonal transport through an NMDA receptor-dependent mechanism that is mediated by glycogen synthase kinase 3beta in primary cultured hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 30, 9166–71.
- Deiss, L.P., Chou, J., Frenkel, N., 1986. Functional domains within the a sequence involved in the cleavage-packaging of herpes simplex virus DNA. *J. Virol.* 59, 605–18.
- Dewachter, I., Filipkowski, R.K., Priller, C., Ris, L., Neyton, J., Croes, S., Terwel, D., Gysemans, M., Devijver, H., Borghgraef, P., Godaux, E., Kaczmarek, L., Herms, J., Van Leuven, F., 2009. Deregulation of NMDA-receptor function and down-stream signaling in APP[V717I] transgenic mice. *Neurobiol. Aging* 30, 241–56.
- Do Carmo, S., Cuello, a C., 2013. Modeling Alzheimer's disease in transgenic rats. *Mol. Neurodegener.* 8, 37.
- Dodart, J.-C., Bales, K.R., Gannon, K.S., Greene, S.J., DeMattos, R.B., Mathis, C., DeLong, C. a, Wu, S., Wu, X., Holtzman, D.M., Paul, S.M., 2002. Immunization reverses memory deficits without reducing brain Abeta burden in Alzheimer's disease model. *Nat. Neurosci.* 5, 452–7.

- Dovgan, A. V, Cherkas, V.P., Stepanyuk, A.R., Fitzgerald, D.J., Haynes, L.P., Tepikin, A. V, Burgoyne, R.D., Belan, P. V, 2010. Decoding glutamate receptor activation by the Ca<sup>2+</sup> sensor protein hippocalcin in rat hippocampal neurons. *Eur. J. Neurosci.* 32, 347–58.
- Dravid, S.M., Erreger, K., Yuan, H., Nicholson, K., Le, P., Lyuboslavsky, P., Almonte, A., Murray, E., Mosely, C., Barber, J., French, A., Balster, R., Murray, T.F., Traynelis, S.F., 2007. Subunit-specific mechanisms and proton sensitivity of NMDA receptor channel block. *J. Physiol.* 581, 107–28.
- Eilam, D., 2003. Open-field behavior withstands drastic changes in arena size. *Behav. Brain Res.* 142, 53–62.
- English, J.D., Sweatt, J.D., 1997. A requirement for the mitogen-activated protein kinase cascade in hippocampal long term potentiation. *J. Biol. Chem.* 272, 19103–6.
- Epstein, A.L., 2009. HSV-1-derived amplicon vectors: recent technological improvements and remaining difficulties--a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104, 399–410.
- Ferreira, I.L., Bajouco, L.M., Mota, S.I., Auberson, Y.P., Oliveira, C.R., Rego, A.C., 2012. Amyloid beta peptide 1-42 disturbs intracellular calcium homeostasis through activation of GluN2B-containing N-methyl-d-aspartate receptors in cortical cultures. *Cell Calcium* 51, 95–106.
- Ferreira, S.T., Klein, W.L., 2011. The A $\beta$  oligomer hypothesis for synapse failure and memory loss in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Learn. Mem.* 96, 529–43.
- Ferreira, S.T., Vieira, M.N.N., De Felice, F.G., 2007. Soluble protein oligomers as emerging toxins in Alzheimer's and other amyloid diseases. *IUBMB Life* 59, 332–45.
- Figueiredo, C.P., Clarke, J.R., Ledo, J.H., Ribeiro, F.C., Costa, C. V., Melo, H.M., Mota-Sales, A.P., Saraiva, L.M., Klein, W.L., Sebollela, A., De Felice, F.G., Ferreira, S.T., 2013. Memantine rescues transient cognitive impairment caused by high-molecular-weight A $\beta$  oligomers but not the persistent impairment induced by low-molecular-weight oligomers. *J. Neurosci.* 33, 9626–34.
- Foster, K. a, McLaughlin, N., Edbauer, D., Phillips, M., Bolton, A., Constantine-Paton, M., Sheng, M., 2010. Distinct roles of NR2A and NR2B cytoplasmic tails in long-term potentiation. *J. Neurosci.* 30, 2676–85.
- Fraefel, C., 2007. Gene delivery using helper virus-free HSV-1 amplicon vectors. *Curr. Protoc. Neurosci.* Chapter 4, Unit 4.14.
- Fraefel, C., Song, S., Lim, F., Lang, P., Yu, L., Wang, Y., Wild, P., Geller, A.I., 1996. Helper virus-free transfer of herpes simplex virus type 1 plasmid vectors into neural cells. *J. Virol.* 70, 7190–7.
- Fukaya, M., Kato, A., Lovett, C., Tonegawa, S., Watanabe, M., 2003. Retention of NMDA receptor NR2 subunits in the lumen of endoplasmic reticulum in targeted NR1 knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 4855–60.
- Gandy, S., 2005. The role of cerebral amyloid beta accumulation in common forms of Alzheimer disease. *J. Clin. Invest.* 115, 1121–9.
- Ge, Y., Dong, Z., Bagot, R.C., Howland, J.G., Phillips, A.G., Wong, T.P., Wang, Y.T., 2010. Hippocampal long-term depression is required for the consolidation of spatial memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 16697–702.
- Georganopoulou, D.G., Chang, L., Nam, J.-M., Thaxton, C.S., Mufson, E.J., Klein, W.L., Mirkin, C.A., 2005. Nanoparticle-based detection in cerebral spinal fluid of a soluble pathogenic biomarker for Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 2273–6.
- Giuffrida, M.L., Caraci, F., Pignataro, B., Cataldo, S., De Bona, P., Bruno, V., Molinaro, G., Pappalardo, G., Messina, A., Palmigiano, A., Garozzo, D., Nicoletti, F., Rizzarelli, E., Copani, A., 2009. Beta-amyloid monomers are neuroprotective. *J. Neurosci.* 29, 10582–7.

- Glennner, G.G., Wong, C.W., 1984. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120, 885–90.
- Glorioso, J.C., DeLuca, N.A., Fink, D.J., 1995. Development and application of herpes simplex virus vectors for human gene therapy. *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 675–710.
- Gong, Y., Chang, L., Viola, K.L., Lacor, P.N., Lambert, M.P., Finch, C.E., Krafft, G.A., Klein, W.L., 2003. Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric A beta ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 10417–22.
- González-Ramírez, M.M., Velázquez-Zamora, D.A., Olvera-Cortés, M.E., González-Burgos, I., 2014. Changes in the plastic properties of hippocampal dendritic spines underlie the attenuation of place learning in healthy aged rats. *Neurobiol. Learn. Mem.* 109, 94–103.
- Gorantla, S., Santos, K., Meyer, V., Dewhurst, S., Bowers, W.J., Federoff, H.J., Gendelman, H.E., Poluektova, L., 2005. Human dendritic cells transduced with herpes simplex virus amplicons encoding human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) gp120 elicit adaptive immune responses from human cells engrafted into NOD/SCID mice and confer partial protection against HIV-1 chal. *J. Virol.* 79, 2124–32.
- Gourley, S.L., Kedves, A.T., Olausson, P., Taylor, J.R., 2009. A history of corticosterone exposure regulates fear extinction and cortical NR2B, GluR2/3, and BDNF. *Neuropsychopharmacology* 34, 707–16.
- Goussard, S., Grillot-Courvalin, C., Courvalin, P., 2003. Eukaryotic promoters can direct protein synthesis in Gram-negative bacteria. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 6, 211–8.
- Graham, F.L., Smiley J., Russell, W.C., Nairn R. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 36: 59–74.
- Grosshans, D.R., Clayton, D. a, Coultrap, S.J., Browning, M.D., 2002. LTP leads to rapid surface expression of NMDA but not AMPA receptors in adult rat CA1. *Nat. Neurosci.* 5, 27–33.
- Grünewald, K., Cyrklaff, M., 2006. Structure of complex viruses and virus-infected cells by electron cryo tomography. *Curr. Opin. Microbiol.* 9, 437–42.
- Guscott, M.R., Clarke, H.F., Murray, F., Grimwood, S., Bristow, L.J., Hutson, P.H., 2003. The effect of (+/-)-CP-101,606, an NMDA receptor NR2B subunit selective antagonist, in the Morris watermaze. *Eur. J. Pharmacol.* 476, 193–9.
- Hardy, J., Selkoe, D.J., 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297, 353–6.
- Henderson, A.K., Pittman, Q.J., Teskey, G.C., 2012. High frequency stimulation alters motor maps, impairs skilled reaching performance and is accompanied by an upregulation of specific GABA, glutamate and NMDA receptor subunits. *Neuroscience* 215, 98–113.
- Henson, M.A., Roberts, A.C., Pérez-Otaño, I., Philpot, B.D., 2010. Influence of the NR3A subunit on NMDA receptor functions. *Prog. Neurobiol.* 91, 23–37.
- Hestrin, S., 1992. Developmental regulation of NMDA receptor-mediated synaptic currents at a central synapse. *Nature* 357, 686–9.
- Hilbich, C., Kisters-Woike, B., Reed, J., Masters, C.L., Beyreuther, K., 1991. Aggregation and secondary structure of synthetic amyloid beta A4 peptides of Alzheimer's disease. *J. Mol. Biol.* 218, 149–63.
- Ho, I.A., Ng, W.H., Lam, P.Y., 2010. FasL and FADD delivery by a glioma-specific and cell cycle-dependent HSV-1 amplicon virus enhanced apoptosis in primary human brain tumors. *Mol. Cancer* 9, 270.
- Hoffmann, H., Gremme, T., Hatt, H., Gottmann, K., 2000. Synaptic activity-dependent developmental regulation of NMDA receptor subunit expression in cultured neocortical neurons. *J. Neurochem.* 75, 1590–9.
- Hollmann, M., Heinemann, S., 1994. Cloned glutamate receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 17, 31–108.

- Huang, Y.Y., Li, X.C., Kandel, E.R., 1994. cAMP Contributes to mossy fiber LTP by initiating both a covalently mediated early phase and macromolecular synthesis-dependent late phase. *Cell* 79, 69–79.
- Impey, S., Obrietan, K., Wong, S.T., Poser, S., Yano, S., Wayman, G., Deloulme, J.C., Chan, G., Storm, D.R., 1998. Cross talk between ERK and PKA is required for Ca<sup>2+</sup> stimulation of CREB-dependent transcription and ERK nuclear translocation. *Neuron* 21, 869–83.
- Iulita, M.F., Allard, S., Richter, L., Munter, L.-M., Ducatenzeiler, A., Weise, C., Do Carmo, S., Klein, W.L., Multhaup, G., Cuello, a C., 2014. Intracellular A $\beta$  pathology and early cognitive impairments in a transgenic rat overexpressing human amyloid precursor protein: a multidimensional study. *Acta Neuropathol. Commun.* 2, 61.
- Izquierdo, I., da Cunha, C., Rosat, R., Jerusalinsky, D., Ferreira, M.B., Medina, J.H., 1992. Neurotransmitter receptors involved in post-training memory processing by the amygdala, medial septum, and hippocampus of the rat. *Behav. Neural Biol.* 58, 16–26.
- Izquierdo, I., Medina, J.H., 1995. Correlation between the pharmacology of long-term potentiation and the pharmacology of memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* 63, 19–32.
- Jacobs, A., Breakefield, X.O., Fraefel, C., 1999. HSV-1-based vectors for gene therapy of neurological diseases and brain tumors: part II. Vector systems and applications. *Neoplasia* 1, 402–16.
- Jacobs, S.A., Tsien, J.Z., 2012. genetic overexpression of NR2B subunit enhances social recognition memory for different strains and species. *PLoS One* 7, e36387.
- Jarrard, L.E., 1993. On the role of the hippocampus in learning and memory in the rat. *Behav. Neural Biol.* 60, 9–26.
- Jerusalinsky, D., Baez, M.V., Epstein, A.L., 2012. Herpes simplex virus type 1-based amplicon vectors for fundamental research in neurosciences and gene therapy of neurological diseases. *J. Physiol. Paris* 106, 2–11.
- Jerusalinsky, D., Epstein, A.L., 2006. Amplicon vectors as outstanding tools to study and modify cognitive functions. *Curr. Gene Ther.* 6, 351–60.
- Jerusalinsky, D., Ferreira, M.B., Walz, R., Da Silva, R.C., Bianchin, M., Ruschel, A.C., Zanatta, M.S., Medina, J.H., Izquierdo, I., 1992. Amnesia by post-training infusion of glutamate receptor antagonists into the amygdala, hippocampus, and entorhinal cortex. *Behav. Neural Biol.* 58, 76–80.
- Johnson, J.W., Ascher, P., 1987. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature* 325, 529–31.
- Jürgensen, S., Antonio, L.L., Mussi, G.E. a, Brito-Moreira, J., Bomfim, T.R., De Felice, F.G., Garrido-Sanabria, E.R., Cavalheiro, É. a, Ferreira, S.T., 2011. Activation of D1/D5 dopamine receptors protects neurons from synapse dysfunction induced by amyloid-beta oligomers. *J. Biol. Chem.* 286, 3270–6.
- Kamphuis, P.J.G.H., Gardoni, F., Kamal, A., Croiset, G., Bakker, J.M., Cattabeni, F., Gispen, W.H., van Bel, F., Di Luca, M., Wiegant, V.M., 2003. Long-lasting effects of neonatal dexamethasone treatment on spatial learning and hippocampal synaptic plasticity: involvement of the NMDA receptor complex. *FASEB J.* 17, 911–3.
- Kandel, E., Schwartz, J., Jessel, T., 1995. *Essentials of Neural Science and Behavior*. Appleton & Lange, Stamford, Connecticut, USA.
- Kashima, T., Vinters, H. V, Campagnoni, A.T., 1995. Unexpected expression of intermediate filament protein genes in human oligodendroglioma cell lines. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 54, 23–31.
- Kawamoto, E.M., Lepsch, L.B., Boaventura, M.F.C., Munhoz, C.D., Lima, L.S., Yshii, L.M., Avellar, M.C.W., Curi, R., Mattson, M.P., Scavone, C., 2008. Amyloid beta-peptide activates nuclear factor-kappaB through an N-methyl-D-aspartate signaling pathway in cultured cerebellar cells. *J. Neurosci. Res.* 86, 845–860.

- Kelly, B.L., Ferreira, A., 2006. beta-Amyloid-induced dynamin 1 degradation is mediated by N-methyl-D-aspartate receptors in hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.* 281, 28079–89.
- Klann, E., Sweatt, J.D., 2008. Altered protein synthesis is a trigger for long-term memory formation. *Neurobiol. Learn. Mem.* 89, 247–59.
- Klein, W.L., Stine, W.B., Teplow, D.B., 2004. Small assemblies of unmodified amyloid beta-protein are the proximate neurotoxin in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 25, 569–80.
- Klyubin, I., Betts, V., Welzel, A.T., Blennow, K., Zetterberg, H., Wallin, A., Lemere, C. a, Cullen, W.K., Peng, Y., Wisniewski, T., Selkoe, D.J., Anwyl, R., Walsh, D.M., Rowan, M.J., 2008. Amyloid beta protein dimer-containing human CSF disrupts synaptic plasticity: prevention by systemic passive immunization. *J. Neurosci.* 28, 4231–7.
- Ko, H.W., Park, K.Y., Kim, H., Han, P.L., Kim, Y.U., Gwag, B.J., Choi, E.J., 1998. Ca<sup>2+</sup>-mediated activation of c-Jun N-terminal kinase and nuclear factor kappa B by NMDA in cortical cell cultures. *J. Neurochem.* 71, 1390–5.
- Kogan, J.H., Frankland, P.W., Blendy, J.A., Coblenz, J., Marowitz, Z., Schütz, G., Silva, A.J., 1997. Spaced training induces normal long-term memory in CREB mutant mice. *Curr. Biol.* 7, 1–11.
- Köhr, G., 2006. NMDA receptor function: subunit composition versus spatial distribution. *Cell Tissue Res.* 326, 439–46.
- Kotilinek, L.A., Bacskai, B., Westerman, M., Kawarabayashi, T., Younkin, L., Hyman, B.T., Younkin, S., Ashe, K.H., 2002. Reversible memory loss in a mouse transgenic model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 22, 6331–5.
- Kozak, M., 1989. The Scanning Model for Translation : An Update 108, 229–241.
- Krisky, D.M., Marconi, P.C., Oligino, T.J., Rouse, R.J., Fink, D.J., Cohen, J.B., Watkins, S.C., Glorioso, J.C., 1998. Development of herpes simplex virus replication-defective multigene vectors for combination gene therapy applications. *Gene Ther.* 5, 1517–30.
- Krugers, H.J., Koolhaas, J.M., Bohus, B., Korf, J., 1993. A single social stress-experience alters glutamate receptor-binding in rat hippocampal CA3 area. *Neurosci. Lett.* 154, 73–7.
- Kwong, A.D., Frenkel, N., 1984. Herpes simplex virus amplicon: effect of size on replication of constructed defective genomes containing eucaryotic DNA sequences. *J. Virol.* 51, 595–603.
- Lacor, P.N., Buniel, M.C., Chang, L., Fernandez, S.J., Gong, Y., Viola, K.L., Lambert, M.P., Velasco, P.T., Bigio, E.H., Finch, C.E., Krafft, G.A., Klein, W.L., 2004. Synaptic targeting by Alzheimer's-related amyloid beta oligomers. *J. Neurosci.* 24, 10191–200.
- Lacor, P.N., Buniel, M.C., Furlow, P.W., Clemente, A.S., Velasco, P.T., Wood, M., Viola, K.L., Klein, W.L., 2007. Abeta oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 27, 796–807.
- Laimbacher, A.S., Esteban, L.E., Castello, A. a, Abdusetir Cerfoglio, J.C., Argüelles, M.H., Glikmann, G., D'Antuono, A., Mattion, N., Berois, M., Arbiza, J., Hilbe, M., Schraner, E.M., Seyffert, M., Dresch, C., Epstein, A.L., Ackermann, M., Fraefel, C., 2012. HSV-1 amplicon vectors launch the production of heterologous rotavirus-like particles and induce rotavirus-specific immune responses in mice. *Mol. Ther.* 20, 1810–20.
- Lambert, M.P., Barlow, A.K., Chromy, B.A., Edwards, C., Freed, R., Liosatos, M., Morgan, T.E., Rozovsky, I., Trommer, B., Viola, K.L., Wals, P., Zhang, C., Finch, C.E., Krafft, G.A., Klein, W.L., 1998. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 6448–53.
- Lambert, M.P., Velasco, P.T., Chang, L., Viola, K.L., Fernandez, S., Lacor, P.N., Khuon, D., Gong, Y., Bigio, E.H., Shaw, P., De Felice, F.G., Krafft, G.A., Klein, W.L., 2007. Monoclonal antibodies that target pathological assemblies of Abeta. *J. Neurochem.* 100, 23–35.

- Lau, C.G., Zukin, R.S., 2007. NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 413–26.
- Lee, I., Kesner, R.P., 2002. Differential contribution of NMDA receptors in hippocampal subregions to spatial working memory. *Nat. Neurosci.* 5, 162–8.
- Leon, W.C., Canneva, F., Partridge, V., Allard, S., Ferretti, M.T., DeWilde, A., Vercauteren, F., Atifeh, R., Ducatenzeiler, A., Klein, W., Szyf, M., Alhonen, L., Cuellar, A.C., 2010. A novel transgenic rat model with a full Alzheimer's-like amyloid pathology displays pre-plaque intracellular amyloid-beta-associated cognitive impairment. *J. Alzheimers. Dis.* 20, 113–26.
- Lesné, S., Koh, M.T., Kotilinek, L., Kaye, R., Glabe, C.G., Yang, A., Gallagher, M., Ashe, K.H., 2006. A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* 440, 352–7.
- Lewin, A., Mayer, M., Chusainow, J., Jacob, D., Appel, B., 2005. Viral promoters can initiate expression of toxin genes introduced into *Escherichia coli*. *BMC Biotechnol.* 5, 19.
- Lisman, J.E., McIntyre, C.C., 2001. Synaptic plasticity: a molecular memory switch. *Curr. Biol.* 11, R788–91.
- Liu, L., Wong, T.P., Pozza, M.F., Lingenhoehl, K., Wang, Y., Sheng, M., Auberson, Y.P., Wang, Y.T., 2004. Role of NMDA receptor subtypes in governing the direction of hippocampal synaptic plasticity. *Science* 304, 1021–4.
- Liu, P., Smith, P.F., Darlington, C.L., 2008. Glutamate receptor subunits expression in memory-associated brain structures: regional variations and effects of aging. *Synapse* 62, 834–41.
- Lorenzo, A., Yankner, B.A., 1994. Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by Congo red. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 12243–7.
- MacDermott, A.B., Mayer, M.L., Westbrook, G.L., Smith, S.J., Barker, J.L., 1986. NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurones. *Nature* 321, 519–22.
- Magnusson, K.R., Brim, B.L., Das, S.R., 2010. Selective Vulnerabilities of N-methyl-D-aspartate (NMDA) Receptors During Brain Aging. *Front. Aging Neurosci.* 2, 11.
- Malinow, R., 2012. New developments on the role of NMDA receptors in Alzheimer's disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* 22, 559–63.
- Mandegar, M.A., Moralli, D., Khoja, S., Cowley, S., Chan, D.Y.L., Yusuf, M., Mukherjee, S., Blundell, M.P., Volpi, E. V., Thrasher, A.J., James, W., Monaco, Z.L., 2011. Functional human artificial chromosomes are generated and stably maintained in human embryonic stem cells. *Hum. Mol. Genet.* 20, 2905–13.
- Manservigi, R., Argnani, R., Marconi, P., 2010. HSV Recombinant Vectors for Gene Therapy. *Open Virol. J.* 4, 123–56.
- Marconi, P., Krisky, D., Oligino, T., Poliani, P.L., Ramakrishnan, R., Goins, W.F., Fink, D.J., Glorioso, J.C., 1996. Replication-defective herpes simplex virus vectors for gene transfer in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 11319–20.
- Marconi, P., Manservigi, R., Epstein, A.L., 2010. HSV-1-derived helper-independent defective vectors, replicating vectors and amplicon vectors, for the treatment of brain diseases. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 13, 169–83.
- Masters, C.L., Simms, G., Weinman, N.A., Multhaup, G., McDonald, B.L., Beyreuther, K., 1985. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 4245–9.
- Matta, J.A., Ashby, M.C., Sanz-Clemente, A., Roche, K.W., Isaac, J.T.R., 2011. mGluR5 and NMDA receptors drive the experience- and activity-dependent NMDA receptor NR2B to NR2A subunit switch. *Neuron* 70, 339–51.

- McAllister, R.M., Melnyk, J., Finkelstein, J.Z., Adams, E.C., Gardner, M.B., 1969. Cultivation in vitro of cells derived from a human rhabdomyosarcoma. *Cancer* 24, 520–6.
- McGeoch, D.J., Dalrymple, M.A., Davison, A.J., Dolan, A., Frame, M.C., McNab, D., Perry, L.J., Scott, J.E., Taylor, P., 1988. The complete DNA sequence of the long unique region in the genome of herpes simplex virus type 1. *J. Gen. Virol.* 69 ( Pt 7), 1531–74.
- McGeoch, D.J., Dolan, A., Donald, S., Brauer, D.H., 1986. Complete DNA sequence of the short repeat region in the genome of herpes simplex virus type 1. *Nucleic Acids Res.* 14, 1727–45.
- McHugh, T.J., Blum, K.I., Tsien, J.Z., Tonegawa, S., Wilson, M. a, 1996. Impaired hippocampal representation of space in CA1-specific NMDAR1 knockout mice. *Cell* 87, 1339–49.
- McVoy, M.A., Nixon, D.E., Adler, S.P., Mocarski, E.S., 1998. Sequences within the herpesvirus-conserved pac1 and pac2 motifs are required for cleavage and packaging of the murine cytomegalovirus genome. *J. Virol.* 72, 48–56.
- Melendez, M.E., Aguirre, A.I., Baez, M.V., Bueno, C.A., Salvetti, A., Jerusalinsky, D.A., Epstein, A.L, 2013. Improvements in HSV-1 derived amplicon vectors for gene transfer. En: “Advances in Viral Genomes Research”. Editores: Borrelli, J.A., Giannini, Y.D. Nova Science Publishers, Nueva York, USA, pp. 1–49.
- Mishizen-Eberz, A.J., Rissman, R. a, Carter, T.L., Ikonomic, M.D., Wolfe, B.B., Armstrong, D.M., 2004. Biochemical and molecular studies of NMDA receptor subunits NR1/2A/2B in hippocampal subregions throughout progression of Alzheimer’s disease pathology. *Neurobiol. Dis.* 15, 80–92.
- Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D.J., Sakmann, B., Seeburg, P.H., 1994. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12, 529–40.
- Monyer, H., Sprengel, R., Schoepfer, R., Herb, A., Higuchi, M., Lomeli, H., Burnashev, N., Sakmann, B., Seeburg, P.H., 1992. Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science* 256, 1217–21.
- Moralli, D., Simpson, K.M., Wade-Martins, R., Monaco, Z.L., 2006. A novel human artificial chromosome gene expression system using herpes simplex virus type 1 vectors. *EMBO Rep.* 7, 911–8.
- Moriyoshi, K., Masu, M., Ishii, T., Shigemoto, R., Mizuno, N., Nakanishi, S., 1991. Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature* 354, 31–7.
- Morris, R.G., Hagan, J.J., Rawlins, J.N., 1986. Allocentric spatial learning by hippocampectomised rats: a further test of the “spatial mapping” and “working memory” theories of hippocampal function. *Q. J. Exp. Psychol. B.* 38, 365–95.
- Nakanishi, N., Axel, R., Shneider, N.A., 1992. Alternative splicing generates functionally distinct N-methyl-D-aspartate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 8552–6.
- Nasseri, M., Mocarski, E.S., 1988. The cleavage recognition signal is contained within sequences surrounding an a-a junction in herpes simplex virus DNA. *Virology* 167, 25–30.
- Neve, R.L., Neve, K.A., Nestler, E.J., Carlezon, W.A., 2005. Use of herpes virus amplicon vectors to study brain disorders. *Biotechniques* 39, 381–91.
- Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A., Prochiantz, A., 1984. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 307, 462–5.
- Oh, J., Fraser, N.W., 2008. Temporal association of the herpes simplex virus genome with histone proteins during a lytic infection. *J. Virol.* 82, 3530–7.
- Olschowka, J.A., Bowers, W.J., Hurley, S.D., Mastrangelo, M.A., Federoff, H.J., 2003. Helper-free HSV-1 amplicons elicit a markedly less robust innate immune response in the CNS. *Mol. Ther.* 7, 218–27.
- Orgogozo, J.-M., Gilman, S., Dartigues, J.-F., Laurent, B., Puel, M., Kirby, L.C., Jouanny, P., Dubois, B., Eisner, L., Flitman, S., Michel, B.F., Boada, M., Frank, A., Hock, C., 2003. Subacute



- meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Abeta42 immunization. *Neurology* 61, 46–54.
- Pachernegg, S., Strutz-Seeböhm, N., Hollmann, M., 2012. GluN3 subunit-containing NMDA receptors: not just one-trick ponies. *Trends Neurosci.* 35, 240–9.
- Paoletti, P., 2011. Molecular basis of NMDA receptor functional diversity. *Eur. J. Neurosci.* 33, 1351–65.
- Paoletti, P., Bellone, C., Zhou, Q., 2013. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 383–400.
- Pardridge, W.M., 2009. Alzheimer's disease drug development and the problem of the blood-brain barrier. *Alzheimers. Dement.* 5, 427–32.
- Paxinos, G., Watson, C., 1986. The rat brain in stereotaxic coordinates. Sydney; Orlando : Academic Press, c1986.
- Pike, C.J., Walencewicz, A.J., Glabe, C.G., Cotman, C.W., 1991. In vitro aging of beta-amyloid protein causes peptide aggregation and neurotoxicity. *Brain Res.* 563, 311–314.
- Prut, L., Belzung, C., 2003. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur. J. Pharmacol.* 463, 3–33.
- Puzzo, D., Privitera, L., Fa', M., Staniszewski, A., Hashimoto, G., Aziz, F., Sakurai, M., Ribe, E.M., Troy, C.M., Mercken, M., Jung, S.S., Palmeri, A., Arancio, O., 2011. Endogenous amyloid- $\beta$  is necessary for hippocampal synaptic plasticity and memory. *Ann. Neurol.* 69, 819–30.
- Quinlan, E.M., Philpot, B.D., Huganir, R.L., Bear, M.F., 1999. Rapid, experience-dependent expression of synaptic NMDA receptors in visual cortex in vivo. *Nat. Neurosci.* 2, 352–7.
- Rauner, C., Köhr, G., 2011. Triheteromeric NR1/NR2A/NR2B receptors constitute the major N-methyl-D-aspartate receptor population in adult hippocampal synapses. *J. Biol. Chem.* 286, 7558–66.
- Rivest, S., 2009. Regulation of innate immune responses in the brain. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 429–39.
- Saydam, O., Glauser, D.L., Fraefel, C., 2012. Construction and packaging of herpes simplex virus/adeno-associated virus (HSV/AAV) Hybrid amplicon vectors. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2012, 352–6.
- Schafe, G.E., Nadel, N. V., Sullivan, G.M., Harris, A., LeDoux, J.E., 1999. Memory Consolidation for Contextual and Auditory Fear Conditioning Is Dependent on Protein Synthesis, PKA, and MAP Kinase. *Learn. Mem.* 6, 97–110.
- Selkoe, D.J., 2001. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol. Rev.* 81, 741–66.
- Sena-Esteves, M., Saeki, Y., Fraefel, C., Breakefield, X.O., 2000. HSV-1 amplicon vectors--simplicity and versatility. *Mol. Ther.* 2, 9–15.
- Shankar, G.M., Bloodgood, B.L., Townsend, M., Walsh, D.M., Selkoe, D.J., Sabatini, B.L., 2007. Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *J. Neurosci.* 27, 2866–2875.
- Shankar, G.M., Li, S., Mehta, T.H., Garcia-Munoz, A., Shepardson, N.E., Smith, I., Brett, F.M., Farrell, M.A., Rowan, M.J., Lemere, C.A., Regan, C.M., Walsh, D.M., Sabatini, B.L., Selkoe, D.J., 2008. Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat. Med.* 14, 837–42.
- Sheng, M., Cummings, J., Roldan, L.A., Jan, Y.N., Jan, L.Y., 1994. Changing subunit composition of heteromeric NMDA receptors during development of rat cortex. *Nature* 368, 144–7.
- Simonato, M., Manservigi, R., Marconi, P., Glorioso, J., 2000. Gene transfer into neurones for the molecular analysis of behaviour: focus on herpes simplex vectors. *Trends Neurosci.* 23, 183–90.
- Sisodia, S.S., St George-Hyslop, P.H., 2002. gamma-Secretase, Notch, Abeta and Alzheimer's disease: where do the presenilins fit in? *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 281–90.

- Sobczyk, A., Scheuss, V., Svoboda, K., 2005. NMDA receptor subunit-dependent  $[Ca^{2+}]$  signaling in individual hippocampal dendritic spines. *J. Neurosci.* 25, 6037–46.
- Spaete, R.R., Frenkel, N., 1982. The herpes simplex virus amplicon: a new eucaryotic defective-virus cloning-amplifying vector. *Cell* 30, 295–304.
- Stevenson, B.J., Hagenbüchle, O., Wellauer, P.K., 1986. Sequence organisation and transcriptional regulation of the mouse elastase II and trypsin genes. *Nucleic Acids Res.* 14, 8307–30.
- Strack, S., Colbran, R.J., 1998. Autophosphorylation-dependent targeting of calcium/ calmodulin-dependent protein kinase II by the NR2B subunit of the N-methyl- D-aspartate receptor. *J. Biol. Chem.* 273, 20689–92.
- Su, Y.-C., Lim, K.-P., Nathan, S., 2003. Bacterial expression of the scFv fragment of a recombinant antibody specific for Burkholderia pseudomallei exotoxin. *J. Biochem. Mol. Biol.* 36, 493–8.
- Swanger, S.A., He, Y.A., Richter, J.D., Bassell, G.J., 2013. Dendritic GluN2A synthesis mediates activity-induced NMDA receptor insertion. *J. Neurosci.* 33, 8898–908.
- Taghibiglou, C., Martin, H.G.S., Lai, T.W., Cho, T., Prasad, S., Kojic, L., Lu, J., Liu, Y., Lo, E., Zhang, S., Wu, J.Z.Z., Li, Y.P., Wen, Y.H., Imm, J.-H., Cynader, M.S., Wang, Y.T., 2009. Role of NMDA receptor-dependent activation of SREBP1 in excitotoxic and ischemic neuronal injuries. *Nat. Med.* 15, 1399–406.
- Tang, Y.P., Shimizu, E., Dube, G.R., Rampon, C., Kerchner, G.A., Zhuo, M., Liu, G., Tsien, J.Z., 1999. Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature* 401, 63–9.
- Tang, Y.P., Wang, H., Feng, R., Kyin, M., Tsien, J.Z., 2001. Differential effects of enrichment on learning and memory function in NR2B transgenic mice. *Neuropharmacology* 41, 779–790.
- Tanzi, R.E., Bertram, L., 2001. New frontiers in Alzheimer’s disease genetics. *Neuron* 32, 181–4.
- Terry, R., Katzman, R., Bick, K., Sisodia, S., 1999. Alzheimer disease. 2nd ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Thiel, C.M., Huston, J.P., Schwarting, R.K., 1998. Hippocampal acetylcholine and habituation learning. *Neuroscience* 85, 1253–62.
- Traynelis, S.F., Wollmuth, L.P., McBain, C.J., Menniti, F.S., Vance, K.M., Ogden, K.K., Hansen, K.B., Yuan, H., Myers, S.J., Dingledine, R., 2010. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol. Rev.* 62, 405–96.
- Tse, Y.C., Bagot, R.C., Hutter, J. a, Wong, A.S., Wong, T.P., 2011. Modulation of synaptic plasticity by stress hormone associates with plastic alteration of synaptic NMDA receptor in the adult hippocampus. *PLoS One* 6, e27215.
- Tsien, J.Z., 2000. Linking Hebb’s coincidence-detection to memory formation. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10, 266–73.
- Tsien, J.Z., Chen, D.F., Gerber, D., Tom, C., Mercer, E.H., Anderson, D.J., Mayford, M., Kandel, E.R., Tonegawa, S., 1996. Subregion- and cell type-restricted gene knockout in mouse brain. *Cell* 87, 1317–26.
- Tsien, J.Z., Huerta, P.T., Tonegawa, S., 1996. The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell* 87, 1327–38.
- Tsitoura, E., Thomas, J., Cuchet, D., Thoinet, K., Mavromara, P., Epstein, A.L., 2009. Infection with herpes simplex type 1-based amplicon vectors results in an IRF3/7-dependent, TLR-independent activation of the innate antiviral response in primary human fibroblasts. *J. Gen. Virol.* 90, 2209–20.
- Turner, P.R., O’Connor, K., Tate, W.P., Abraham, W.C., 2003. Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Prog. Neurobiol.* 70, 1–32.

- Udagawa, T., Swanger, S.A., Takeuchi, K., Kim, J.H., Nalavadi, V., Shin, J., Lorenz, L.J., Zukin, R.S., Bassell, G.J., Richter, J.D., 2012. Bidirectional control of mRNA translation and synaptic plasticity by the cytoplasmic polyadenylation complex. *Mol. Cell* 47, 253–66.
- Velasco, P.T., Heffern, M.C., Sebollela, A., Popova, I.A., Lacor, P.N., Lee, K.B., Sun, X., Tiano, B.N., Viola, K.L., Eckermann, A.L., Meade, T.J., Klein, W.L., 2012. Synapse-binding subpopulations of A $\beta$  oligomers sensitive to peptide assembly blockers and scFv antibodies. *ACS Chem. Neurosci.* 3, 972–81.
- Vianna, M.R., Alonso, M., Viola, H., Quevedo, J., de Paris, F., Furman, M., de Stein, M.L., Medina, J.H., Izquierdo, I., 2000. Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat. *Learn. Mem.* 7, 333–40.
- Vicini, S., Wang, J.F., Li, J.H., Zhu, W.J., Wang, Y.H., Luo, J.H., Wolfe, B.B., Grayson, D.R., 1998. Functional and pharmacological differences between recombinant N-methyl-D-aspartate receptors. *J. Neurophysiol.* 79, 555–66.
- Vlazny, D. a, Frenkel, N., 1981. Replication of herpes simplex virus DNA: localization of replication recognition signals within defective virus genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 742–6.
- Von Engelhardt, J., Doganci, B., Jensen, V., Hvalby, Ø., Göngrich, C., Taylor, A., Barkus, C., Sanderson, D.J., Rawlins, J.N.P., Seeburg, P.H., Bannerman, D.M., Monyer, H., 2008. Contribution of hippocampal and extra-hippocampal NR2B-containing NMDA receptors to performance on spatial learning tasks. *Neuron* 60, 846–60.
- Walsh, D.M., Klyubin, I., Fadeeva, J. V, Cullen, W.K., Anwyl, R., Wolfe, M.S., Rowan, M.J., Selkoe, D.J., 2002. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 416, 535–9.
- Walsh, D.M., Selkoe, D.J., 2004. Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. *Neuron* 44, 181–93.
- Wang, D., Cui, Z., Zeng, Q., Kuang, H., Wang, L.P., Tsien, J.Z., Cao, X., 2009. Genetic enhancement of memory and long-term potentiation but not CA1 long-term depression in NR2B transgenic rats. *PLoS One* 4, e7486.
- Wang, L.Y., MacDonald, J.F., 1995. Modulation by magnesium of the affinity of NMDA receptors for glycine in murine hippocampal neurones. *J. Physiol.* 486 (Pt 1), 83–95.
- Watanabe, M., Inoue, Y., Sakimura, K., Mishina, M., 1992. Developmental changes in distribution of NMDA receptor channel subunit mRNAs. *Neuroreport* 3, 1138–40.
- Wickens, J., 1988. Electrically coupled but chemically isolated synapses: dendritic spines and calcium in a rule for synaptic modification. *Prog. Neurobiol.* 31, 507–28.
- Wilcock, D.M., Rojiani, A., Rosenthal, A., Subbarao, S., Freeman, M.J., Gordon, M.N., Morgan, D., 2004. Passive immunotherapy against A $\beta$  in aged APP-transgenic mice reverses cognitive deficits and depletes parenchymal amyloid deposits in spite of increased vascular amyloid and microhemorrhage. *J. Neuroinflammation* 1, 24.
- Witt, A., Macdonald, N., Kirkpatrick, P., 2004. Memantine hydrochloride. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 109–10.
- Wu, G.Y., Deisseroth, K., Tsien, R.W., 2001. Spaced stimuli stabilize MAPK pathway activation and its effects on dendritic morphology. *Nat. Neurosci.* 4, 151–8.
- Yang, S.N., Tang, Y.G., Zucker, R.S., 1999. Selective induction of LTP and LTD by postsynaptic [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> elevation. *J. Neurophysiol.* 81, 781–7.
- Yashiro, K., Philpot, B.D., 2008. Regulation of NMDA receptor subunit expression and its implications for LTD, LTP, and metaplasticity. *Neuropharmacology* 55, 1081–94.

- Yasumura, Y., Kawakita, Y., 1963. Studies on SV40 in tissue culture - Preliminary step for cancer research in vitro. *Nihon Rinsho* 21, 1201–15.
- Yin, J.C., Wallach, J.S., Del Vecchio, M., Wilder, E.L., Zhou, H., Quinn, W.G., Tully, T., 1994. Induction of a dominant negative CREB transgene specifically blocks long-term memory in *Drosophila*. *Cell* 79, 49–58.
- Yin, X., Feng, X., Takei, Y., Hirokawa, N., 2012. Regulation of NMDA receptor transport: a KIF17-cargo binding/releasing underlies synaptic plasticity and memory in vivo. *J. Neurosci.* 32, 5486–99.
- Yin, X., Takei, Y., Kido, M. a, Hirokawa, N., 2011. Molecular motor KIF17 is fundamental for memory and learning via differential support of synaptic NR2A/2B levels. *Neuron* 70, 310–25.
- Yu, S.Y., Wu, D.C., Zhan, R.Z., 2010. GluN2B subunits of the NMDA receptor contribute to the AMPA receptor internalization during long-term depression in the lateral amygdala of juvenile rats. *Neuroscience* 171, 1102–8.
- Zaupa, C., Revol-Guyot, V., Epstein, A.L., 2003. Improved packaging system for generation of high-level noncytotoxic HSV-1 amplicon vectors using Cre-loxP site-specific recombination to delete the packaging signals of defective helper genomes. *Hum. Gene Ther.* 14, 1049–63.
- Zhang, G., Geller, A.I., 2010. A helper virus-free HSV-1 vector containing the vesicular glutamate transporter-1 promoter supports expression preferentially in VGLUT1-containing glutamatergic neurons. *Brain Res.* 1331, 12–9.
- Zhao, W.-Q., De Felice, F.G., Fernandez, S., Chen, H., Lambert, M.P., Quon, M.J., Krafft, G.A., Klein, W.L., 2008. Amyloid beta oligomers induce impairment of neuronal insulin receptors. *FASEB J.* 22, 246–60.
- Zhao, X., Rosenke, R., Kronemann, D., Brim, B., Das, S.R., Dunah, a W., Magnusson, K.R., 2009. The effects of aging on N-methyl-D-aspartate receptor subunits in the synaptic membrane and relationships to long-term spatial memory. *Neuroscience* 162, 933–45.
- Zhou, Q., Sheng, M., 2013. NMDA receptors in nervous system diseases. *Neuropharmacology* 74, 69–75.
- Zhou, Z.H., Chen, D.H., Jakana, J., Rixon, F.J., Chiu, W., 1999. Visualization of tegument-capsid interactions and DNA in intact herpes simplex virus type 1 virions. *J. Virol.* 73, 3210–8.
- Zola, S.M., Squire, L.R., 2001. Relationship between magnitude of damage to the hippocampus and impaired recognition memory in monkeys. *Hippocampus* 11, 92–8.
- Zou, W., Guo, Q., Chen, C., Yang, Y., Wang, E., n.d. Intrathecal herpes simplex virus type 1 amplicon vector-mediated human proenkephalin reduces chronic constriction injury-induced neuropathic pain in rats. *Mol. Med. Rep.* 4, 529–33.